

Université de Montréal

**Mécanismes de défense immunitaire innée impliqués dans l'hépatite aiguë induite
par le virus de l'hépatite murine de type 3**

Par
Alexandre Jacques

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de
doctorat en microbiologie et immunologie

octobre, 2008

© Alexandre Jacques, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Mécanismes de défense immunitaire innée impliqués dans l'hépatite aiguë induite
par le virus de l'hépatite murine de type 3**

Présentée par :
Alexandre Jacques

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Carolina Alfieri
(présidente-rapporteur)

Dre Lucie Lamontagne
(directrice de recherche)

Dr Marc Bilodeau
(membre du jury)

Dre Tatiana Scorza
(examinatrice externe)

Dr George Szatmari
(représentant du doyen de la FES)

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Le virus de l'hépatite murine de type 3 (MHV3) est un excellent modèle animal pour l'étude des différents désordres immunologiques lors d'infections virales. L'hépatite aiguë fulminante induite par ce virus chez la souris susceptible C57BL/6 se caractérise par la présence de plusieurs foyers nécrotiques et inflammatoires dans le foie associée à une immunodéficience en lymphocytes B et T, tuant les souris entre 3 et 5 jours post-infection. L'évolution rapide de cette maladie virale suggère un débalancement dans les mécanismes de l'immunité naturelle sous le contrôle des cellules NK et NK-T et un bris de l'équilibre entre la tolérance hépatique et la réponse inflammatoire. Afin d'élucider les rôles respectifs des différents mécanismes de la défense innée impliqués dans le développement de l'hépatite aiguë, des infections *in vivo* ont été réalisées chez des souris C57BL/6 avec la souche pathogène L2-MHV3 ou avec des variants du virus MHV3. Ces derniers possèdent des tropismes différents pour les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques et les cellules de Kupffer, tels que le virus faiblement atténué 51.6-MHV3, fortement atténué CL12-MHV3 et non pathogène YAC-MHV3. Ces études *in vivo* ont montré une diminution des cellules NK spléniques et myéloïdes suite à une infection avec le virus MHV3. Cette chute en cellules NK spléniques reflète un recrutement de ces cellules au niveau du foie. Par contre, les cellules NK se sont avérées permissives à la réplication virale entraînant un processus d'apoptose suite à la formation de syncytia induits par le virus. Les niveaux de recrutement et d'apoptose des cellules NK et NK-T dans le foie reflètent la pathogénicité des variants MHV3 durant les trois premiers jours de l'infection virale bien que les cellules NK recrutées au niveau du foie maintiennent leur activité cytotoxique. L'ajout des IL-12 et IL-18, qui sont normalement diminués lors de l'hépatite aiguë, provoque une production synergique d'IFN- γ par les cellules NK, résultant d'une interaction entre l'activation de la voie p38 MAPK et la réplication virale. Par ailleurs, le récepteur viral CEACAM1a (carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1a) serait essentiel à cette synergie, mais exercerait aussi une action inhibitrice dans la production de l'IFN- γ . D'autre part, les niveaux de production des cytokines immunosuppressives IL-10, TGF- β et PGE₂, impliquées dans la tolérance hépatique et particulièrement produites par les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales sinusoidales, sont en relation inverse avec le degré de pathogénicité des variants du virus MHV3. Finalement, le virus pathogène L2-MHV3 déclenche la production de cytokines inflammatoires par les macrophages, tels que l'IL-6 et le TNF- α . L'induction de ces cytokines par les macrophages serait indépendante de la présence de la molécule CEACAM1a. Cette stimulation est plutôt reliée à la fixation des particules virales sur des récepteurs TLR2, en association avec les régions riches en héparanes sulfates. Tous ces résultats mettent en évidence de nouveaux mécanismes par lesquels le virus MHV3 peut diminuer l'efficacité des mécanismes de l'immunité naturelle sous le contrôle des cellules NK et

NK-T intrahépatiques, suite à une stimulation de l'inflammation résultant du bris de la tolérance hépatique.

MOTS CLÉS : Hépatite aiguë, virus MHV3, cellules NK et NK-T, cellules de Kupffer, cellules endothéliales hépatiques, IFN- γ , inflammation, CEACAM1a, récepteurs Toll-like, cytokines.

RÉSUMÉ EN ANGLAIS

Mouse hepatitis virus type 3 (MHV3) is an excellent model to study immunological disorders related to viral infections. The fulminant acute hepatitis induced in susceptible C57BL/6 mice is characterized by the presence of necrotic and inflammatory foci in the liver associated with B and T cell immunodeficiencies leading to the death of the animals in 3 to 5 days post-infection. The fulminance of this viral infection suggests a deficiency in the natural immunity mechanisms under control of NK and NK-T cells and an imbalance between the hepatic tolerance and the inflammatory responses. To understand the different mechanisms involved in the acute hepatitis, *in vivo* infections have been done in C57BL/6 mice with either the pathogenic L2-MHV3, or with its attenuated variants: the weak attenuated 51.6-MHV3, the highly attenuated CL12-MHV3 or the non-pathogenic YAC-MHV3 viruses, possessing different tropisms for liver sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. The results demonstrate that splenic and myeloid NK cells are impaired during a MHV3 infection. This impairment is due to a recruitment of these cells in the liver and a virus-induced apoptotic phenomenon. The recruitment and the subsequent apoptosis of NK and NK-T cells during the first three days of infection are in relation with the pathogenicity of the MHV3 variants. In spite of the fact that hepatic recruited NK cells are still cytotoxic, these cells undergo apoptosis due to viral replication via the formation of syncytia. Addition of IL-12 and IL-18, which are impaired during the acute hepatitis, promote a synergistic IFN- γ production by NK cells depending of both the p38 MAPK pathway and the viral replication. Moreover, the specific viral receptor CEACAM1a (carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1a) is essential for this response but also exerts an inhibitory action. Levels of the immunosuppressive cytokines IL-10, TGF- β and PGE₂, mainly produced by Kupffer cells and sinusoidal endothelial cells, and implicated in the natural hepatic tolerance, are in inverse correlation with the pathogenicity of the MHV3 variants. Finally, viral infection promotes the secretion of IL-6 and TNF- α by macrophages, triggered by the fixation of viral particules to TLR2 and heparan sulfate receptors rather than the engagement of CEACAM1a receptor and viral replication. In conclusion, our results suggest new mechanisms by which the MHV3 virus disturbs the innate immunity under control of NK and NK-T cells, as well as the cytokines involved in the hepatic tolerance to the detriment of the inflammatory response.

KEY WORDS : Acute hepatitis, MHV3 virus, NK and NK-T cells, Kupffer cells, liver endothelial sinusoidal cells, IFN- γ , inflammation, CEACAM1a, Toll-like receptors, cytokines.

 TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|------|
| PAGE D'IDENTIFICATION DU JURY | ii |
| RÉSUMÉ EN FRANÇAIS..... | iii |
| RÉSUMÉ EN ANGLAIS..... | v |
| TABLE DES MATIÈRES..... | vi |
| LISTE DES TABLEAUX..... | xii |
| LISTE DES FIGURES..... | xiii |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | xvii |
| REMERCIEMENTS..... | xxi |
| | |
| 1- INTRODUCTION..... | 1 |
| | |
| 2- REVUE DE LITTÉRATURE..... | 4 |
| | |
| 2.1- L'hépatite virale..... | 5 |
| 2.1.1- Nature et rôles des différents types de cellules hépatiques..... | 7 |
| 2.1.1.1- Hépatocytes et cellules de Ito | 8 |
| 2.1.1.2- Les cellules de Kupffer (KC)..... | 9 |
| 2.1.1.3- Les cellules dendritiques hépatiques | 10 |
| 2.1.1.4- Les cellules endothéliales sinusoïdales (LSEC)..... | 11 |
| 2.1.1.5- Les cellules T régulatrices | 12 |
| 2.1.2- La tolérance hépatique..... | 13 |
| 2.1.3- Les observations pathologiques de l'hépatite | 16 |
| 2.1.4- La réaction inflammatoire hépatique..... | 17 |
| 2.1.4.1- L'hépatite B humaine | 17 |
| 2.1.4.2- L'hépatite C humaine | 19 |
| 2.2- Les cellules NK et NK-T..... | 21 |
| 2.2.1- Caractéristiques des cellules NK..... | 21 |
| 2.2.2- Caractéristiques des cellules NK-T | 22 |
| 2.2.3- Cytokines libérées par les cellules NK et NK-T | 24 |
| 2.2.4- Activité cytotoxique des cellules NK et NK-T | 26 |
| 2.2.5- Les cellules NK et NK-T intrahépatiques..... | 29 |
| 2.3- Les coronavirus..... | 32 |
| 2.3.1- Historique..... | 32 |
| 2.3.2- Immunopathologie inflammatoire induite par les coronavirus..... | 33 |
| 2.3.3- Structure des coronavirus | 35 |
| 2.3.4- Réplication des coronavirus..... | 38 |
| 2.3.4.1- Étapes de la réplication virale | 38 |

| | |
|--|----|
| 2.3.4.2- Signalisation intracellulaire impliquée dans la réplication virale ... | 40 |
| 2.4- Le virus de l'hépatite murine de type 3 | 42 |
| 2.4.1- Introduction | 42 |
| 2.4.2- L'hépatite aiguë..... | 42 |
| 2.4.3- L'hépatite chronique..... | 45 |
| 2.4.4- Les variants de pathogénicité du virus MHV3 | 46 |
| 2.4.4.1- Production des variants de pathogénicité du virus MHV3 | 46 |
| 2.4.4.2- Le tropisme cellulaire des variants de pathogénicité du virus MHV3..... | 48 |
| 2.5- Le récepteur spécifique reconnu des MHV : la molécule CEACAM1 | 48 |
| 2.5.1- Structure et expression des molécules CEACAM | 48 |
| 2.5.2- Rôles associés au récepteur CEACAM1 | 51 |
| 2.5.3- Rôles du récepteur CEACAM1 sur les cellules immunitaires..... | 52 |
| 2.5.4- Signalisation intracellulaire induite par le CEACAM1 | 54 |
| 2.5.5- Régulation du récepteur CEACAM1 | 55 |
| 2.6- Les récepteurs viraux non spécifiques des coronavirus | 56 |
| 2.6.1- Les régions riches en héparanes sulfates | 56 |
| 2.6.2- Les récepteurs Toll-like (TLR) | 58 |
| 2.7- Hypothèses | 62 |
| 3- RÉSULTATS | 65 |
| 3.1- Article 1: Murine viral hepatitis involves NK cell depletion associated with virus-induced apoptosis | 66 |
| 3.1.1- Abstract | 68 |
| 3.1.2- Introduction..... | 68 |
| 3.1.3- Materials and methods..... | 71 |
| 3.1.3.1- Mice | 71 |
| 3.1.3.2- Viruses | 71 |
| 3.1.3.3- <i>In vivo</i> viral infection..... | 71 |
| 3.1.3.4- Cells..... | 72 |
| 3.1.3.5- <i>In vitro</i> viral infection in NK cells | 73 |
| 3.1.3.6- Flow cytometric analysis | 73 |
| 3.1.3.7- Virus titration | 74 |
| 3.1.3.8- TUNEL test..... | 74 |
| 3.1.3.9- Cytotoxic test | 75 |
| 3.1.3.10- Statistical analysis | 75 |
| 3.1.4- Results..... | 76 |

| | |
|---|-----|
| 3.1.4.1- Viral replication of pathogenic L2-MHV3 and attenuated YAC-MHV3 viruses in liver, spleen and bone marrow from C57BL/6 mice | 76 |
| 3.1.4.2- NK1.1 ⁺ cell subsets from livers of C57BL/6 mice infected with pathogenic L2-MHV3 or attenuated YAC-MHV3 viruses..... | 77 |
| 3.1.4.3- Splenic NK1.1 ⁺ and B cells from C57BL/6 mice infected with pathogenic L2-MHV3 or attenuated YAC-MHV3 viruses..... | 79 |
| 3.1.4.4- Production of NK1.1 ⁺ and B220 ⁺ cells in bone marrow from mock-infected, L2-MHV3- and YAC-MHV3-infected mice ... | 82 |
| 3.1.4.5- Cytotoxic properties of liver, spleen and bone marrow NK1.1 ⁺ cells from L2-MHV3- and YAC-MHV3-infected mice. | 84 |
| 3.1.4.6- <i>In vitro</i> infections of IL-15-stimulated bone marrow NK1.1 ⁺ cells with either the pathogenic L2-MHV3 or the attenuated YAC-MHV3 strain | 86 |
| 3.1.4.7- <i>In vitro</i> infections of intrahepatic IL-15-stimulated NK1.1/ $\alpha\beta$ -TCR cell subsets with the pathogenic L2-MHV3 and the attenuated YAC-MHV3 viruses | 88 |
| 3.1.5- Discussion | 89 |
| 3.1.6- Acknowledgements | 93 |
| 3.2- Article 2: Intrahepatic endothelial and Kupffer cells involved in immunosuppressive cytokines and NK/NK-T cell disorders in the viral acute hepatitis | 94 |
| 3.2.1- Abstract | 96 |
| 3.2.2- Introduction..... | 96 |
| 3.2.3- Materials and methods..... | 99 |
| 3.2.3.1- Mice..... | 99 |
| 3.2.3.2- Viruses..... | 100 |
| 3.2.3.3- <i>In vivo</i> viral infection..... | 101 |
| 3.2.3.4- Cells..... | 101 |
| 3.2.3.5- <i>In vitro</i> viral infection..... | 102 |
| 3.2.3.6- Flow cytometric analysis | 102 |
| 3.2.3.7- TdT-mediated biotin-dUTP nick-end labelling (TUNEL) assay | 102 |
| 3.2.3.8- Determination of intracytoplasmic viral proteins | 103 |
| 3.2.3.9- Cytokine determinations by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)..... | 103 |
| 3.2.3.10- Statistical analysis | 103 |
| 3.2.4- Results..... | 104 |
| 3.2.4.1- Pathology induced by the pathogenicity variants of MHV3 in susceptible C57BL/6 mice | 104 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 3.2.4.2- | Impairment of intrahepatic immunosuppressive cytokine production during an acute viral hepatitis induced by the pathogenic L2-MHV3, low attenuated 51.6-MHV3, highly attenuated CL12-MHV3 and non-pathogenic YAC-MHV3 viruses | 104 |
| 3.2.4.3- | Intrahepatic IFN- γ /IL-4 ratio reflects the pathogenicity of the different MHV3 variants | 106 |
| 3.2.4.4- | The CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ cell population is not involved in the production of intrahepatic immunosuppressive cytokines in attenuated MHV3-infected mice | 109 |
| 3.2.4.5- | Intrahepatic NK1.1 ⁺ β TCR ⁻ , NK1.1 ⁺ β TCR ⁺ and NK1.1 ⁻ β TCR ⁺ cells in livers from mice infected with the pathogenic MHV3 variants | 110 |
| 3.2.4.6- | Relationships between hepatic NK/NK-T cell ratios and hepatitis levels | 115 |
| 3.2.4.7- | Permissivity of NK and NK-T cells to viral infection by the pathogenic L2-MHV3, low attenuated 51.6-MHV3, highly attenuated CL12-MHV3 and non-pathogenic YAC-MHV3 viruses | 117 |
| 3.2.5- | Discussion | 118 |
| 3.2.6- | Acknowledgements | 125 |
| 3.3- | Article 3: A synergistic interferon- γ production is induced by mouse hepatitis virus in IL-12/IL-18-activated NK cells and modulated by CEACAM1a receptor | 126 |
| 3.3.1- | Abstract | 129 |
| 3.3.2- | Introduction | 129 |
| 3.3.3- | Materials and methods | 132 |
| 3.3.3.1- | Mice | 132 |
| 3.3.3.2- | Viruses | 132 |
| 3.3.3.3- | <i>In vivo</i> viral infection | 133 |
| 3.3.3.4- | Cells | 133 |
| 3.3.3.5- | <i>Ex vivo</i> viral infection | 134 |
| 3.3.3.6- | <i>In vitro</i> viral infection | 135 |
| 3.3.3.7- | Flow cytometric analysis | 135 |
| 3.3.3.8- | Cytokine determinations by ELISA assays | 136 |
| 3.3.3.9- | Statistical analysis | 136 |
| 3.3.4- | Results | 136 |
| 3.3.4.1- | MHV3 infection synergizes the production of IFN- γ by intrahepatic MNCs in the presence of IL-12 and IL-18 | 136 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 3.3.4.2- | NK cells are responsible for the production of IFN- γ in response to a combined treatment with the L2-MHV3 virus and IL-12/IL-18 | 139 |
| 3.3.4.3- | <i>Ceacam1a</i> ^{-/-} NK cells do not promote the synergistic IFN- γ production in the presence of IL-12 and IL-18 | 141 |
| 3.3.4.4- | Viral replication is essential to promote the synergistic IFN- γ production in NK cells | 142 |
| 3.3.4.5- | Inhibitory role of CEACAM1a in the IFN- γ production in the presence of MHV3 | 143 |
| 3.3.4.6- | The p38 MAPK pathway is involved in the synergistic IFN- γ production in NK cells | 146 |
| 3.3.4.7- | IL-12, IL-18 and IFN- γ production decrease in liver from L2-MHV3-infected C57BL/6 mice | 148 |
| 3.3.4.8- | Apoptosis of intrahepatic NK1.1 ⁺ β TCR ⁻ cells during the acute viral hepatitis | 149 |
| 3.3.5- | Discussion | 152 |
| 3.3.6- | Acknowledgements | 156 |
| 3.4- | Article 4: Macrophage IL-6 and TNF- α are induced by coronavirus fixation to TLR2/heparan sulfate receptors but not CEACAM1a | 158 |
| 3.4.1- | Abstract | 161 |
| 3.4.2- | Introduction | 161 |
| 3.4.3- | Materials and methods | 164 |
| 3.4.3.1- | Mice | 164 |
| 3.4.3.2- | Viruses | 165 |
| 3.4.3.3- | <i>In vivo</i> viral infection | 165 |
| 3.4.3.4- | Histopathologic analysis | 166 |
| 3.4.3.5- | Virus titration | 166 |
| 3.4.3.6- | Cells | 166 |
| 3.4.3.7- | <i>In vitro</i> viral infection | 167 |
| 3.4.3.8- | Cytokine determinations by ELISA assays | 167 |
| 3.4.3.9- | Statistical analysis | 167 |
| 3.4.4- | Results | 168 |
| 3.4.4.1- | Secretion of macrophage IL-6 and TNF- α induced by MHV3 does not depend on activation of CEACAM1a | 168 |
| 3.4.4.2- | Membrane regions enriched in heparan sulfate are implicated in the secretion of IL-6 and TNF- α by macrophages in the presence of MHV3 | 171 |
| 3.4.4.3- | The MHV3 virus uses TLR2 to induce the production of IL-6 and TNF- α | 172 |

| | |
|--|-----|
| 3.4.4.4- TLR2/heparan sulfate is involved in the production of IL-6 and TNF- α in MHV3-infected macrophages through MAPK..... | 174 |
| 3.4.4.5- MHV3's S protein, but not viral replication, induces the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α | 176 |
| 3.4.4.6- Production of IL-6 and TNF- α in the liver of MHV3-infected C57BL/6 and <i>Tlr2</i> ^{-/-} mice | 178 |
| 3.4.5- Discussion | 180 |
| 3.4.6- Acknowledgements | 184 |
| | |
| 4- DISCUSSION | 185 |
| | |
| 4.1- Le recrutement et l'apoptose des cellules NK durant l'hépatite aiguë induite par le virus MHV3 | 186 |
| 4.2- Le tropisme cellulaire des variants de pathogénicité du virus MHV3 dirige la tolérance immunitaire hépatique | 188 |
| 4.3- Les fonctions des cellules NK durant l'hépatite aiguë induite par le virus MHV3 | 191 |
| 4.4- Les rôles de la molécule CEACAM1a lors d'une infection par un virus MHV | 194 |
| 4.5- Importance des régions riches en héparanes sulfates et des TLRs durant une infection par un coronavirus | 197 |
| 4.6- Intégration du modèle MHV3 en virologie et immunologie | 200 |
| 4.7- Perspectives futures | 202 |
| | |
| 5- RÉFÉRENCES | 205 |
| | |
| 6- ANNEXES | 269 |
| 6.1- Article 1: Murine viral hepatitis involves NK cell depletion associated with virus-induced apoptosis | 270 |
| 6.2- Article 2: Intrahepatic endothelial and Kupffer cells involved in immunosuppressive cytokines and NK/NK-T cell disorders in the viral acute hepatitis | 282 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| Table I. Résumé des mécanismes de cytotoxicité des cellules NK et NK-T. | 29 |
| Table II. Infectious virus titers in liver, spleen and bone marrow from pathogenic L2-MHV3- and attenuated YAC-MHV3-infected C57BL/6 mice | 77 |
| Table III. Percentages and absolute numbers of NK1.1/ $\alpha\beta$ -TCR cell subsets in liver from mock-infected, L2-MHV3- and YAC-MHV3-infected C57BL/6 mice..... | 78 |
| Table IV. Characterization of pathogenic properties and cell tropisms of MHV3 variants | 100 |
| Table V. Normal and apoptotic intrahepatic natural killer (NK)/NK-T cell ratios in pathogenic L2-mouse hepatitis virus type 3 (MHV3)-, low attenuated 51.6-MHV3-, highly attenuated CL12-MHV3- and non-pathogenic YAC-MHV3-infected C57BL/6 mice at various times post-infection | 116 |
| Table VI. Summary of immunological observations in livers from C57BL/6 mice infected with pathogenic L2-mouse hepatitis virus type 3 (MHV3), low attenuated 51.6-MHV3, highly attenuated CL12-MHV3 and non-pathogenic YAC-MHV3 viruses | 120 |
| Table VII. Production of IFN- γ at 24 hrs p.i. in L2-MHV3-infected myeloid MNCs from wild type C57BL/6 mice in the absence or presence of rIL-12/rIL-18 | 140 |
| Table VIII. Production of IFN- γ at 24 hrs p.i. in L2-MHV3-infected myeloid MNCs from wild type C57BL/6 and <i>Ceacam1a</i> ^{-/-} mice in the absence or presence of rIL-12/rIL-18 | 142 |
| Table IX. Production of IFN- γ at 24 hrs p.i. in rIL-12/rIL-18-treated and L2-MHV3-infected total myeloid cells or purified DX5 ⁺ cells from wild type C57BL/6 mice in the presence of the p38 MAPK (SB203580) or ERK-1/2 MAPK (U0126) inhibitors.. | 147 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1. Modèle de la structure cellulaire du foie | 8 |
| Figure 2. Résumé général de la réaction immunitaire hépatique lors d'une infection par les virus de l'hépatite humaine | 14 |
| Figure 3. Structure des coronavirus | 37 |
| Figure 4. Réplication des coronavirus..... | 40 |
| Figure 5. Structure et expression des différentes molécules CEACAM..... | 50 |
| Figure 6. Section I- Flow cytometric analysis of normal (R1 region) (d, e, f) and larger (R2 region) (g, h, i) NK ⁺ and B220 ⁺ lymphoid cells in spleen from mock-infected (a, d and g), and L2-MHV3- (b, e and h) and YAC-MHV3- (c, f and i) infected C57BL/6 mice at 72 hrs p.i. Section II- Absolute numbers of normal (a and c) and larger (b and d) NK1.1 ⁺ cells (a and b) and B220 ⁺ lymphocytes (c and d) in spleen from mock-infected (■), L2-MHV3- (□) and YAC-MHV3- (▣) infected C57BL/6 mice at 24 hrs p.i. | 81 |
| Figure 7. Section I- Flow cytometric analysis of normal (R1 region) (d, e, f) and larger (R2 region) (g, h, i) NK1.1 ⁺ and B220 ⁺ lymphoid cells in bone marrow from mock-infected (a, d and g) and L2-MHV3- (b, e and h) and YAC-MHV3- (c, f and i) infected C57BL/6 mice at 72 hrs p.i. Section II- Absolute numbers of normal (a and c) and larger (b and d) NK1.1 ⁺ cells (a and b) and B220 ⁺ lymphocytes (c and d) in bone marrow from mock-infected (■), L2-MHV3- (□) and YAC-MHV3- (▣) infected C57BL/6 mice at 24 hrs p.i. | 84 |
| Figure 8. Determination of the percentage of cytotoxic activity of the splenic (a), myeloid (b) and intrahepatic (c) NK1.1 ⁺ cells from mock-infected (■), L2-MHV3 (◇) and YAC-MHV3 (▲) -infected C57BL/6 mice at 72 hrs p.i..... | 85 |
| Figure 9. Section I- Percentages of total (a) and NK1.1 ⁺ (b) normal (■) and larger (□) cells in control, L2-MHV3- and YAC-MHV3-infected myeloid cells stimulated <i>in vitro</i> with IL-15 from C57BL/6 mice. | 88 |

Figure 10. Percentages of NK1.1⁺TCR⁻, NK1.1⁺TCR^{inter}, NK⁻TCR^{inter} and NK⁻TCR^{high} cells in *in vitro* L2-MHV3- and YAC-MHV3-infected intrahepatic lymphoid cells stimulated with IL-15. 89

Figure 11. Production of intrahepatic interleukin (IL)-10 (A), transforming growth factor (TGF)- β (B) and prostaglandin E₂ (PGE₂) (C) in mock-, L2-mouse hepatitis virus type 3 (MHV3)-, 51.6-MHV3-, CL12-MHV3- and YAC-MHV3-infected C57BL/6 mice at various times post-infection. 106

Figure 12. Section I- Production of intrahepatic interferon (IFN)- γ (A) and interleukin (IL)-4 (B) in mock-, L2-mouse hepatitis virus type 3 (MHV3)-, 51.6-MHV3-, CL12-MHV3- and YAC-MHV3-infected C57BL/6 mice at various times post-infection (p.i.). **Section II-** Intrahepatic IFN- γ /IL-4 ratios in L2-MHV3-, 51.6-MHV3-, CL12-MHV3- and YAC-MHV3-infected C57BL/6 mice at various times p.i. 108

Figure 13. Numbers of CD4⁺ forkhead box P3⁺ (FoxP3⁺) (A) and CD4⁺FoxP3⁻ (B) cells, and percentages of CD4⁺FoxP3⁺ cells within the intrahepatic CD4⁺ cell population (C) from mock-, L2- mouse hepatitis virus type 3 (MHV3)-, 51.6-MHV3-, CL12-MHV3- and YAC-MHV3-infected C57BL/6 mice at 72 hrs p.i. 110

Figure 14. Section I- Expression of TdT-mediated biotin-dUTP nick-end labelling⁺ cells in normal (G1 region) and apoptotic (G2 region) intrahepatic mononuclear cells from mock- and L2-mouse hepatitis virus type 3 (MHV3)-infected C57BL/6 mice (A) and dot plots of the double immunolabelling fluorescein isothiocyanate-NK1.1 and phycoerythrin-T cell receptor (TCR)- β from mock- and L2-MHV3-infected C57BL/6 mice (B). **Section II-** Normal (A, C, E) and apoptotic (B, D, F) intrahepatic NK1.1⁺ β TCR⁻ (A, B), NK1.1⁺ β TCR⁺ (C, D) and NK1.1⁻ β TCR⁺ (E, F) cells in mock-, L2-MHV3-, 51.6-MHV3-, CL12-MHV3- and YAC-MHV3-infected C57BL/6 mice at various times post-infection. 114

Figure 15. Expression of mouse hepatitis virus type 3 (MHV3) proteins in the intrahepatic DX5⁺ (A-D) cell and CD1d:Ig⁺ (E-H) cell populations infected *in vitro* with the L2-MHV3 (A, E), 51.6-MHV3 (B, F), CL12-MHV3 (C, G) and YAC-MHV3 (D, H) viruses. 118

Figure 16. Section I- Production of IFN- γ from intrahepatic MNCs purified from mock- and L2-MHV3-infected C57BL/6 mice after 72 hrs and treated *ex vivo* during 24 hrs with rIL-12 and rIL-18. **Section II-** Production of IFN- γ in *in vitro* mock-

infected and L2-MHV3- infected intrahepatic MNCs from C57BL/6 mice at 24 hrs p.i. in the absence (A) or presence of rIL-12 (B), rIL-18 (C) and rIL-12/rIL-18 (D). 138

Figure 17. Production of IFN- γ at 24 hrs p.i. in *in vitro* myeloid MNCs from C57BL/6 mice infected with infectious L2-MHV3 viruses or UV-treated L2-MHV3 viruses in the presence of rIL-12/rIL-18 at 24 hrs p.i. 143

Figure 18. Production of IFN- γ in *in vitro* L2-MHV3-infected myeloid MNCs from C57BL/6 mice in the presence of rIL-12/rIL-18, pre-treated or not with 2 μ g of coated AgB10 (A). Production of IFN- γ in *in vitro* L2-MHV3-infected myeloid MNCs from C57BL/6 mice in the presence of rIL-12/rIL-18, pre-treated or not with different concentrations of SS (B) 145

Figure 19. Production of intrahepatic IFN- γ (A), IL-12 (B) and IL-18 (C) in liver extracts from mock- and L2-MHV3-infected C57BL/6 mice at 72 hrs p.i. 149

Figure 20. Normal (A) and apoptotic (B) intrahepatic NK1.1⁺ β TCR⁻ cells in mock- and L2-MHV3-infected C57BL/6 mice at various times p.i. 151

Figure 21. Production of IL-6 (A and C) and TNF- α (B and D) by *in vitro* uninfected- and L2-MHV3-infected C57BL/6 (A and B) and *Ceacam1a*^{-/-} (C and D) peritoneal macrophages at 24 hrs p.i. 169

Figure 22. Production of IL-6 (A and C) and TNF- α (B and D) by *in vitro* L2-MHV3-infected C57BL/6 peritoneal macrophages in the presence of an anti-CEACAM1a antibody or a SHP-1 inhibitor. 170

Figure 23. Production of IL-6 (A and C) and TNF- α (B and D) by *in vitro* L2-MHV3-infected C57BL/6 (A and B) and *Ceacam1a*^{-/-} (C and D) peritoneal macrophages in the presence of heparin. 172

Figure 24. Production of IL-6 (A) TNF- α (B) by *in vitro* uninfected- and L2-MHV3-infected C57BL/6 and *Tlr2*^{-/-} peritoneal macrophages at 24 hrs p.i. Production of IL-6 (C) and TNF- α (D) by *in vitro* L2-MHV3-infected peritoneal macrophages from C57BL/6 mice in presence of a functional grade TLR2 mAb at 24 hrs p.i. 173

Figure 25. Roles of p38 and ERK-1/2 MAPK in the production of IL-6 (A and C) and TNF- α (B and D) by *in vitro* L2-MHV3-infected C57BL/6 (A and B) and *Ceacam1a*^{-/-} (C and D) peritoneal macrophages. 174

Figure 26. Roles of NF- κ B and JNK in the production of IL-6 (A and C) and TNF- α (B and D) by *in vitro* L2-MHV3-infected C57BL/6 (A and B) and *Ceacam1a*^{-/-} (C and D) peritoneal macrophages..... 176

Figure 27. Roles of viral S protein and viral replication in the production of IL-6 (A and C) and TNF- α (B and D) by *in vitro* L2-MHV3-infected C57BL/6 (A and B) and *Ceacam1a*^{-/-} (C and D) peritoneal macrophages. 177

Figure 28. Section I- Intrahepatic IL-6 (A) TNF- α (B) levels in liver extracts from mock-infected and L2-MHV3-infected C57BL/6 and *Tlr2*^{-/-} mice at 96 hrs p.i. **Section II-** Histopathologic observations of livers from control (A and C) and L2-MHV3-infected (B and D) C57BL/6 (A and B) and *Tlr2*^{-/-} (C and D) mice at 96 hrs p.i. 179

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- aa : acide aminé (amino acid)
ADCC : Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (Antibody-dependent cellular cytotoxicity)
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNdb : Acide désoxyribonucléique double brin
 α GalCer : α -galactosidécéramide (α -galactosideceramide)
ALT : Alanine aminotransférase
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
AP-1 : Protéine activatrice 1 (Activating protein 1)
ARN : Acide ribonucléique
ARNdb : Acide ribonucléique double brin (double stranded RNA : dsRNA)
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ARNsb : Acide ribonucléique simple brin (single stranded RNA : ssRNA)
AST : Aspartate aminotransférase
Bgp : Glycoprotéine biliaire (Biliary glycoprotein)
BM : Moelle osseuse (Bone marrow)
BSA : Sérum d'albumine bovine (Bovine serum albumin)
CCL : Chimiokine possédant des motifs C-C (chemokine (C-C motif) ligand)
CCR : Récepteur à chimiokine possédant des motifs C-C (Chemokine (C-C motif) receptor)
CD : Marqueur de différenciation (Cluster of differentiation)
CEACAM : (Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule)
CIPA : Comité institutionnel de protection des animaux
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
ConA : Concanavaline A (Concanavalin A)
CPA : Cellule présentatrice d'antigènes
CPE : Effet cytopathique (Cytopathic effect)
CTL : Lymphocyte T cytotoxique (Cytotoxic T lymphocyte)
CTLA-4 : (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4)
CXCL : Chimiokine possédant des motifs C-X-C (Chemokine (C-X-C motif) ligand)
CXCR : Récepteur à chimiokine possédant des motifs C-X-C (Chemokine (C-X-C motif) receptor)
DC : Cellule dendritique (Dendritic cell)
DN : Double négative
eIF4E : (Eukaryotic translation initiation factor 4E)
ELISA : (Enzyme linked immunosorbent assay)
ERK : Kinase régulant le signal extracellulaire (Extracellular signal-regulated kinase)

Fab : Fragment liant l'antigène (Fragment antigen binding)
FACScan : (Fluorescence-activated cell flow cytometer scan)
FasL : Ligand Fas (Fas ligand)
Fc : Fragment cristallisable des immunoglobulines
Fc γ R : Récepteur du fragment cristallisable γ
FCS : Sérum de veau foetal (Fetal calf serum)
FITC : Fluorescéine isothiocyanate
fgl-2 : (Fibrinogen-like protein 2)
FoxP3 : Boîte P3 de la famille Forkhead (Forkhead box P3)
FSC : Mesure de la taille cellulaire (Forward scatter)
GGT : γ -glutamyl-transférase
GITR : (Glucocorticoid-induced TNF receptor family-related protein)
HAV : Virus de l'hépatite A (Hepatitis A virus)
HBV : Virus de l'hépatite B (Hepatitis B virus)
HCMV : Cytomégalovirus humain (Human cytomegalovirus)
HCoV : Coronavirus humain (Human coronavirus)
HCV : Virus de l'hépatite C (Hepatitis C virus)
HDV : Virus de l'hépatite D (Hepatitis D virus)
HE : Hémagglutinine-estérase
HEPA : Filtre de particules aériennes à haute efficacité (High efficiency particulate air filter)
HEV : Virus de l'hépatite E (Hepatitis E virus)
HGV : Virus de l'hépatite G (Hepatitis G virus)
HIV : Virus de l'immunodéficience humaine (Human immunodeficiency virus)
HR : Région hypervariable (Hypervariable region)
HSV : Virus de l'herpès simplex (Herpes simplex virus)
IBV : Virus de la bronchite infectieuse (Infectious bronchitis virus)
ICTV : Comité international de taxonomie virale (International committee on the taxonomy of viruses)
IFN : Interféron (Interferon)
Ig : Immunoglobuline (Immunoglobulin)
IL : Interleukine (Interleukin)
i.p. : Intrapéritonéal (Intraperitoneal)
IRAK : Kinase associée au récepteur de l'IL-1 (IL-1R-associated kinase)
IRF : (Interféron regulatory factor)
ITAM : Immunorécepteur associé à des tyrosines à fonction activatrice (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif)
ITIM : Immunorécepteur associé à des tyrosines à fonction inhibitrice (Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)
JNK : Kinase c-Jun N-terminale (c-Jun N-terminal kinase)

KC : Cellule de Kupffer (Kupffer cell)
KIR : Récepteur inhibiteur des cellules NK (Killer-cell inhibitory receptor)
LCMV : Virus de la chorioméningite lymphocytaire (Lymphocytic choriomeningitis virus)
LDH : Lactate déshydrogénase (Lactate dehydrogenase)
LFA-1 : (Lymphocyte function-associated antigen-1)
LPS : Lipopolysaccharide
LSEC : Cellule endothéliale sinusoidale hépatique (Liver sinusoidal endothelial cell)
Mab : Anticorps monoclonal (Monoclonal antibody)
MAPK : (Mitogen-activated protein kinase)
MCMV : Cytomégalovirus murin (Murine cytomegalovirus)
MCP-1 : (Macrophage chemoattractant protein-1)
MHV : Virus de l'hépatite murine (Mouse hepatitis virus)
MIP : (Macrophage inflammatory protein)
MNC : Cellule mononucléée (Mononuclear cell)
m.o.i. : Multiplicité d'infection (Multiplicity of infection)
MyD88 : (Myeloid differentiation factor 88)
NF- κ B : Facteur nucléaire kappa B (Nuclear factor-kappa B)
NK : Cellule tueuse naturelle (Natural killer cell)
NK-T : Cellule tueuse naturelle possédant le récepteur TCR (Natural killer-T cell)
Nod : (Nucleotide-binding oligomerization domain)
ORF : Séquence à cadre de lecture ouvert (Open reading frame)
PAMP : Structures moléculaires associées à des pathogènes (Pathogen-associated molecular patterns)
PBMC : Cellule mononucléée du sang périphérique (Peripheral blood mononuclear cell)
PBS : Tampon phosphate salin (Phosphate buffered saline)
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase chain reaction)
PE : Phycoérythrine
PEG : Polyéthylène glycol
PGE₂ : Prostaglandine E₂
PHA : Phytohémagglutinine
p.i. : Post-infection
PI3K : Phosphoinositol-3-kinase
PPR : Récepteurs reconnaissant des structures moléculaires (Pattern recognition receptors)
rIL : Interleukine recombinante
rmIL : Interleukine recombinante murine
rpm : Rotation par minute
SARS : Syndrome respiratoire aigu sévère (Severe acute respiratory syndrome)
SHP : (Src homology phosphatase)

SOCS : (Suppressor of cytokine signaling)
SS : Stibogluconate de sodium (Sodium stibogluconate)
SSC : Mesure de la granulosité cellulaire (Side scatter)
STAT : (Signal transducer and activator of transcription)
TAP : Protéines associées à des transporteurs (Transporter associated proteins)
TCID : Dose infectieuse dans une culture de tissu (Tissue culture infectious dose)
TCR : Récepteur des cellules T (T cell receptor)
TGF- β : Facteur de croissance transformant β (Tumor growth factor β)
Th : Cellule T auxiliaire (T helper cell)
TIR : (Toll/IL-1R gene homology)
TIRAP : (Toll/IL-1R domain-containing adaptor protein)
TLR : Récepteur Toll-like (Toll-like receptor)
TMR : Tétraméthylrhodamine
TNF : Facteur de nécrose tumorale (Tumor necrosis factor)
Tr1 : Cellule T régulatrice de type 1 (Type 1 regulatory T cell)
TRAF : (TNF receptor-associated factor)
TRAIL : (TNF-related apoptosis-inducing ligand)
TRAM : (TRIF-related adaptor molecule)
T_{reg} : Cellule T régulatrice (Regulatory T cell)
TRIF : (TIR containing adaptor-inducing IFN- β)
TRITC : Tétraméthyl rhodamine isothiocyanate
TUNEL : (TdT-mediated biotin-dUTP nick-end labelling)
UTR : Région non traduite (Untranslated region)
UV : Ultraviolet
VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Vascular endothelial growth factor)

REMERCIEMENTS

J'aimerais avant tout remercier ma directrice de recherche, Dre Lucie Lamontagne, qui m'a chaleureusement accueilli dans son laboratoire et qui m'a admirablement encadré pendant toutes mes années d'études graduées. Merci de m'avoir aidé à dépasser mes limites, à me perfectionner au niveau scientifique et technique, d'avoir cru en moi et de m'avoir confié ce projet de recherche si stimulant.

J'aimerais également remercier le Dre Nicole Beauchemin, de l'Université McGill à Montréal, pour sa généreuse contribution à mon projet de recherche, sans quoi il n'aurait jamais été aussi riche en nouvelles découvertes.

Je tiens à remercier le Dre Tatiana Scorza, pour toutes les discussions que nous avons eues et l'écoute dont elle a fait preuve afin de m'aider dans mon cheminement scientifique.

Un gros merci à l'assistant de recherche Christian Bleau, avec qui j'ai travaillé pendant plus de 7 ans, et sans qui plusieurs expériences n'auraient pas pu avoir lieu sans son aide. Merci, d'avoir mis de l'ambiance et de la joie dans ce laboratoire, par tes rires, tes farces et tes histoires. Merci énormément pour ton support et ton écoute dans les moments plus critiques.

Je remercie les étudiant(e)s du laboratoire: Mélanie Lehoux, Chantale Auger, Alexia Monges, Luciana Poggi, Annie Gosselin, Patrice Larose Charbonneau et Isabelle Poirier, de même que tous mes stagiaires: Marisol Michaud, Cécile Troupin, Martine Baril et Jean-Philippe Gaudet qui, au cours des années, m'ont énormément aidé dans l'avancement de mon projet de recherche.

Je voudrais finalement remercier mes parents et ma famille pour leur soutien moral, de m'avoir si ardemment encouragé à poursuivre et à terminer ses magnifiques études. Merci également à ma conjointe Geneviève qui m'a soutenu et motivé dans ce dernier droit, et sans qui ma vie ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui. Merci!

1- INTRODUCTION

L'hépatite est une atteinte inflammatoire du foie ayant plusieurs causes dont certains virus hépatotropes. Cependant, les mécanismes par lesquels l'infection virale entraîne des désordres inflammatoires dans un environnement hépatique normalement immunotolérant ne sont pas clairement élucidés. Par conséquent, l'utilisation d'un modèle murin d'infection virale, telle que celui induit par le virus de l'hépatite murine de type 3 (MHV3), devient un outil important dans la compréhension des mécanismes favorisant, dans les premiers jours d'infection, l'établissement d'une hépatite. Le virus pathogène L2-MHV3 induit une hépatite fulminante chez la souris susceptible C57BL/6 causant sa mort dans les 3 à 5 jours suivant l'infection.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à identifier les mécanismes impliqués dans les déficits fonctionnels des cellules NK myéloïdes et intrahépatiques apparaissant durant les premiers jours de l'infection par le virus MHV3, de même que les mécanismes d'établissement des réponses inflammatoires et de bris de tolérance induits lors de l'hépatite fulminante. Au cours de cette thèse, il sera démontré que le virus MHV3 entraîne un recrutement de cellules NK cytotoxiques dans le foie des souris infectées et provoque leur apoptose et un dysfonctionnement dans leur capacité à produire convenablement de l'IFN- γ . De plus, plusieurs mécanismes par lesquels la réponse inflammatoire est fortement induite lors de l'infection par le virus MHV3 seront identifiés. L'importance de la permissivité des cellules hépatiques à l'infection virale dans le maintien de l'équilibre entre l'inflammation et la tolérance immunitaire hépatique sera analysée en fonction du niveau de pathogénicité virale.

La revue de littérature sera orientée vers la structure et la réplication des coronavirus, les différentes propriétés des variants de pathogénicité du virus MHV3, de même que les mécanismes immunopathologiques et d'immunodéficiences qu'ils induisent. La structure et les fonctions du récepteur spécifique au virus MHV3, la molécule CEACAM1a, seront également approfondies. L'emphase sera mise sur l'importance des différentes cellules hépatiques, notamment les cellules NK et NK-T, et leur implication dans l'induction des réponses d'immunotolérance et d'inflammation. Fort de ces informations, nos hypothèses de travail seront présentées et démontrées sous la forme de quatre articles.

Ainsi, la section résultats sera divisée en quatre parties, chacune correspondant à un article scientifique. Le premier article s'intitulant «Murine viral hepatitis involves NK cell depletion associated with virus-induced apoptosis», publié en 2004 dans *Clinical and Experimental Immunology* démontre que les virus pathogène L2-MHV3 et non pathogène YAC-MHV3 entraînent *in vivo* une diminution des cellules NK suite à leur permissivité virale. Le deuxième article s'intitulant «Intrahepatic endothelial and Kupffer cells involved in immunosuppressive cytokines and NK/NK-T cell disorders in the viral acute hepatitis» publié en 2008 dans la revue *Clinical and Experimental Immunology*, montre que la susceptibilité des cellules de Kupffer et des cellules endothéliales sinusoidales influence le recrutement et l'apoptose des cellules NK et NK-T de même que le maintien de la tolérance immunitaire hépatique gérée par les cytokines IL-10, TGF- β et la PGE₂. Le troisième article s'intitulant «A synergistic interferon- γ production is induced by mouse hepatitis virus in IL-12/IL-18-activated NK cells and modulated by CEACAM1a receptor» est en soumission dans la revue *Journal of Leukocyte Biology* et met en évidence le fait que la présence des IL-12 et IL-18 est essentielle afin de permettre une production synergique d'IFN- γ par les cellules NK myéloïdes, normalement recrutées au niveau du foie lors de l'hépatite aiguë induite par le virus pathogène L2-MHV3. La molécule CEACAM1a de même que la voie p38 MAPK permettrait cette induction synergique. Le dernier article s'intitulant «Macrophage IL-6 and TNF- α are induced by coronavirus fixation to TLR2/heparan sulfate receptors but not CEACAM1a», récemment accepté dans la revue *Immunology*, révèle que la réponse inflammatoire induite par le virus pathogène L2-MHV3 ne dépend pas de la molécule CEACAM1a, mais plutôt de l'activation du récepteur TLR2 dans des régions riches en héparanes sulfates suite à la fixation de la protéine virale S.

Une discussion générale établissant les liens entre les résultats présentés dans les différents articles, concernant l'immunité naturelle médiée par les cellules NK et les mécanismes inflammatoires et de tolérance immunitaire, terminera cette thèse.

2- REVUE DE LITTÉRATURE

2.1- L'hépatite virale

Naturellement, le foie a comme fonction le métabolisme des acides aminés, des acides gras, des lipoprotéines, des hydrates de carbone, des protéines plasmiqes et des vitamines. De plus, les cellules hépatiques doivent être en mesure d'éliminer les produits toxiques présents dans l'organisme (Knolle et Gerken, 2000). L'hépatite est une inflammation du foie causée par plusieurs facteurs différents dont les médicaments, l'alcool, ou encore des micro-organismes pathogènes et est associée à l'atteinte des défenses immunitaires innées et/ou adaptatives. Le foie est un organe privilégié au niveau immunitaire dans la mesure où il maintient normalement un état de tolérance immunitaire, mais il peut également supporter une réponse inflammatoire. La nécessité d'un phénomène de tolérance hépatique est expliquée par la présence continue des antigènes alimentaires et bactériens provenant du système digestif (Crispe, 2003). Cependant, le foie doit garder sa capacité à répondre convenablement à des micro-organismes pathogènes, afin d'éviter l'établissement d'une infection aiguë ou chronique. Cet état de tolérance ne doit pas empêcher une réponse adéquate des cellules immunitaires hépatiques résidentes telles que les lymphocytes B et T, les cellules NK (natural killer) et NK-T de même que des LSEC (cellule endothéliale sinusoidale hépatique), KC (cellule de Kupffer) et hépatocytes advenant l'arrivée d'un pathogène (Knolle et Gerken, 2000; Crispe, 2003).

Chez l'humain, six différents virus causant des hépatites ont été identifiés soient les virus de l'hépatite A (HAV), B (HBV), C (HCV), D (HDV), E (HEV) et G (HGV). Les virus HAV et HEV sont transmis par la voie fécale-orale et provoquent des hépatites aiguës alors que les virus HBV, HCV et HDV sont transmis par les liquides biologiques et provoquent des hépatites aiguës et/ou chroniques. Cependant, les signes cliniques et la pathologie reliés à l'infection par le HGV ne sont pas encore bien définis (Gillcrist, 1999).

Le HAV appartient à la famille des *Picornaviridae* et possède un ARN simple brin (ARNsb) de polarité positive. Il s'agit d'une particule sphérique de 27 à 28 nm de diamètre et non enveloppée. Une infection par le HAV peut être asymptomatique ou

conduire à une hépatite aiguë de sévérité plus ou moins importante (Gillcrist, 1999). La transmission du HAV est essentiellement fécale-orale, donc liée à l'absorption d'aliments ou de boissons contaminés, alors que la transmission verticale est très rare (Ranger-Rogez *et al.*, 2002).

Le HBV est une particule virale enveloppée de 42 nm de diamètre appartenant à la famille des *Hepadnaviridae*. Il existe 6 génotypes de ce virus et son génome est composé d'un ADN double brin (ADNdb) partiel et circulaire (London et Evans, 1996; Ranger-Rogez *et al.*, 2002). Le virus de l'hépatite B est retrouvé dans la plupart des liquides biologiques et la transmission s'effectue donc par voie sexuelle, sanguine ou mère-enfant (Cadranet *et al.*, 1999).

Le HCV est un virus enveloppé de 40 à 50 nm de diamètre et à ARNsb de polarité positive. Le virus de l'hépatite C appartient à la famille des *Flaviviridae* et 6 génotypes différents sont actuellement connus (London et Evans, 1996; Sharara *et al.*, 1996). La transmission de ce virus s'effectue principalement par la voie sanguine et rarement par les voies sexuelles ou périnatales (Ranger-Rogez *et al.*, 2002).

Le HDV est un virus dit satellite, de 35 à 40 nm de diamètre et possédant un ARNsb de polarité négative (Polish *et al.*, 1993). Cependant, le virus de l'hépatite D a la particularité d'être un virus défectif. En effet, sa réplication dans les hépatocytes et son infectivité dépendent entièrement de l'enveloppe du HBV (Rizzetto, 1983). Les voies de transmission du HDV sont les mêmes que celles du HBV et une co-infection HBV/HDV augmenterait les risques d'hépatite aiguë sévère, voire fulminante (Ranger-Rogez *et al.*, 2002).

Le HEV possède des caractéristiques similaires à la famille des *Caliciviridae*, quoiqu'il soit non classifié officiellement, et est composé d'un ARNsb de polarité positive. Il s'agit d'un virus à capsid icosaédrique de 27 à 34 nm de diamètre et non enveloppé (Mast et Krawczynski, 1996). Le virus de l'hépatite E présente une grande variabilité antigénique. Effectivement, plus de 8 génotypes sont actuellement connus (Ranger-Rogez *et al.*, 2002). Tout comme le HAV, sa transmission s'effectue de façon

fécale-orale via de l'eau contaminée et rarement par contact direct avec des individus atteints (Gillcrisp, 1999; Ranger-Rogez *et al.*, 2002).

Concernant le HGV, il s'agirait d'un virus enveloppé, à ARNs^b de polarité positive appartenant à la famille des *Flaviviridae* (Cheung *et al.*, 1997). Les modes de transmission du HGV ne sont pas encore connus (Gillcrisp, 1999) et certaines études démontreraient la non pathogénicité de ce virus, puisqu'il n'y a pas apparition d'hépatite aiguë ou chronique de façon évidente chez les patients infectés (Cheung *et al.*, 1997; Cheung et Keeffe, 1997; Alter *et al.*, 1997).

2.1.1- Nature et rôles des différents types de cellules hépatiques

Le foie est constitué de plusieurs types cellulaires (Figure 1) pouvant favoriser un état de tolérance immunitaire ou induire des réponses inflammatoires. L'implication et l'action des hépatocytes, des KC, des LSEC et des cellules dendritiques sur les cellules lymphoïdes résidentes ou recrutées via la veine porte, telles que les lymphocytes B, les lymphocytes T et les cellules NK, déterminent l'état immunologique du foie.

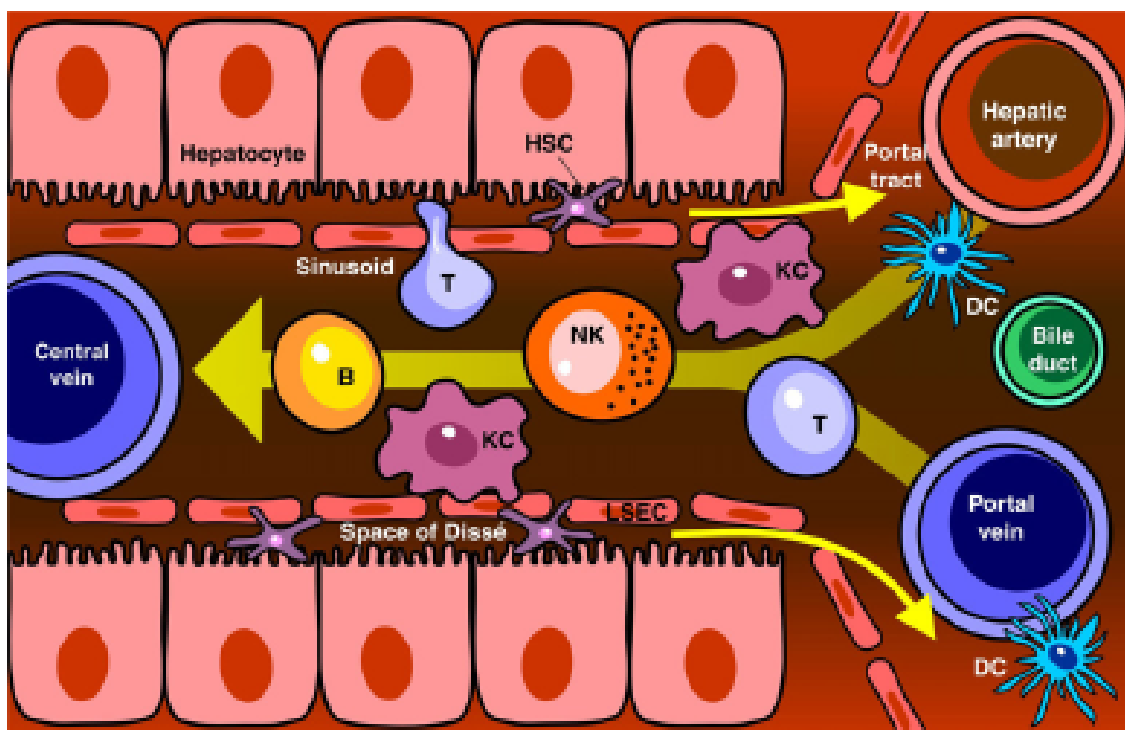


Figure 1. Modèle de la structure cellulaire du foie (Fainboim *et al.*, 2007)

(HSC, hepatic stellate cell [Ito]; KC, Kupffer cell; DC, dendritic cell; NK, natural killer cell; LSEC, liver sinusoidal endothelial cell)

2.1.1.1- Hépatocytes et cellules de Ito

Les hépatocytes sont des cellules parenchymateuses qui constituent près du deux-tiers des cellules totales du foie. Ces cellules ont la particularité de posséder un ou plusieurs noyaux et des microvillosités pouvant permettre l'adhérence des lymphocytes (Fainboim *et al.*, 2007). Les hépatocytes assurent plusieurs fonctions métaboliques dont la synthèse du glycogène (Tosh et Agius, 1995), la néoglucogenèse (Verne et Hebert, 1964), la dégradation de l'hémoglobine (Beaumont et Canonne-Hergaux, 2005), la formation de la bile (Shibahara *et al.*, 2002) et la transformation de nombreuses substances toxiques comme l'alcool (Gheorghiu *et al.*, 2004). De plus, les hépatocytes peuvent présenter des antigènes aux cellules T infiltrées dans le foie ou encore permettre une activation des cellules NK-T via l'expression à leur surface de la molécule CD1

(Racanelli et Rehmann, 2006). Les hépatocytes seraient également en mesure d'activer les cellules T CD8⁺ naïves sans toutefois favoriser leur survie (Bertolino *et al.*, 1998). Cependant, leur rôle dans l'induction d'une réponse immunitaire primaire reste mal défini.

Les cellules de Ito, ou cellules stellaires, sont de nature non parenchymateuse et sont localisées entre les LSEC et les hépatocytes (Senoo, 2004). Ces cellules permettent l'accumulation de dérivés rétinoliques, tels que la vitamine A et ses métabolites dans leur cytoplasme (Matano *et al.*, 1999). Lors d'une pathologie, telle que la cirrhose hépatique, la morphologie des cellules de Ito est modifiée vers une forme étoilée. Ces cellules perdent leurs composés rétinoliques, prolifèrent et se mettent à sécréter de grandes quantités de matrice extracellulaire, dont du collagène, des glycoprotéines et du protéoglycane, causant ainsi une fibrose hépatique. (Majno, 1979).

2.1.1.2- Les cellules de Kupffer (KC)

Les cellules de Kupffer sont des monocytes résidents du foie et retrouvés principalement dans les sinusoides hépatiques, mais qui peuvent également entrer en contact avec les hépatocytes. Les KC sont mobiles et possèdent une activité phagocytaire très élevée pour les micro-organismes (Filice, 1988; Ruggiero *et al.*, 1977) et les cellules apoptotiques (Shi *et al.*, 1996). Elles permettent d'influencer les fonctions des autres cellules hépatiques, telles que les cellules de Ito, les hépatocytes et les LSEC. Trois fonctions générales ont été attribuées aux KC, l'élimination des endotoxines bactériennes présentes normalement dans le sang apporté par la veine porte, la production de médiateurs solubles et la présentation d'antigènes (Knolle *et al.*, 1995).

Les récepteurs Toll-like (TLR) exprimés à la surface des KC semblent très importants dans le développement de différentes pathologies ou infections. Il a été démontré que le traitement des rates par le nafamostat mésilate, un inhibiteur de protéases, protégeait contre l'hépatotoxicité induite par le lipopolysaccharide (LPS), en diminuant l'expression des molécules CD14 et TLR4 à la surface des KC. Ainsi, il en résultait une diminution des niveaux de TNF- α (tumor necrosis factor α), d'interleukine

(IL)-1 β et d'interféron (IFN)- γ intrahépatiques (Miyaso *et al.*, 2006). Lors d'une induction d'un traumatisme hémorragique chez la souris, il a été observé que les KC activaient différentes voies MAPK (mitogen-activated protein kinase) et que la production sélective de chimiokines et de cytokines inflammatoires, telles que les IL-6, TNF- α et MCP-1 (macrophage chemoattractant protein-1). Cette production était en fait régulée via l'activation des TLR2, TLR4 et TLR9 (Thobe *et al.*, 2007), mais le récepteur TLR4 semblait être le plus critique dans l'établissement de la réponse inflammatoire suivant le traumatisme hémorragique (Frink *et al.*, 2007). Dans le cas d'une stéato-hépatite non-alcoolique, il a été démontré que la molécule TLR4 exprimée à la surface des KC jouait un rôle important dans cette pathologie (Rivera *et al.*, 2007). Dans le cas des hépatites virales humaines, il a été observé que l'IFN- γ , les endotoxines (via le TLR4) de même que la protéine « core » du HCV (via le TLR2) pouvaient maintenir une activation continue des monocytes/macrophages, favorisant une inflammation persistante chez les patients chroniquement infectés (Dolganiuc *et al.*, 2007). De même, il a été démontré que le système immunitaire inné, par les TLRs exprimés à la surface des KC, pouvait potentiellement contrôler la réplication du HBV via la libération des interférons de types α et β (Isogawa *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2007).

2.1.1.3- Les cellules dendritiques (DC) hépatiques

Bien que les cellules de Kupffer soient un bon système de détection des antigènes étrangers, les cellules dendritiques (DC) hépatiques sont considérées comme des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles qui patrouillent le foie (Crispe, 2003). Lors de leur passage dans les sinusoides hépatiques, les cellules dendritiques vont interagir avec les KC via des asialoglycoprotéines afin de faciliter les présentations antigéniques croisées menant à une meilleure induction du système immunitaire contre des pathogènes (Uwatoku *et al.*, 2001; Higashi *et al.*, 2002). Cependant, les DC hépatiques sont majoritairement immatures et expriment peu de molécules de co-stimulation et de CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) à leur surface permettant une activation adéquate des cellules T (Lau et Thomson, 2003). De plus, il est proposé

que les DC hépatiques, au contraire des KC et LSEC, n'expriment pas d'activité phagocytaire importante. Seulement les DC hépatiques résidentes exprimant la molécule CD8 α seraient phagocytaires (Lau et Thomson, 2003).

2.1.1.4- Les cellules endothéliales sinusoidales (LSEC)

Les cellules endothéliales sinusoidales ont la caractéristique d'être fenestrées, ce qui permet la diffusion de lipoprotéines et de macromolécules du sang vers les hépatocytes (Masopust *et al.*, 2001). Il est à noter qu'une diminution de la fenestration des LSEC occasionne une chute des fonctions métaboliques des hépatocytes, pouvant causer subséquemment des perturbations hépatiques (Lamireau *et al.*, 2002). Les LSEC expriment aussi des molécules leur permettant de reconnaître ou de présenter des antigènes, telles que les récepteurs au mannose, les marqueurs CD40, CD80 et CD86 (Lohse *et al.*, 1996). Malgré le fait que les LSEC peuvent présenter des antigènes à des cellules T CD4⁺ et CD8⁺, la conséquence d'une telle activation est plus souvent qu'autrement une induction de tolérance (Knolle *et al.*, 1999a; Limmer *et al.*, 2000). Ainsi, il a été observé que les LSEC humaines n'exprimaient normalement pas les molécules de co-stimulation CD80 et CD86 de façon constitutive, rendant inadéquate l'activation des cellules T. Cependant, leur expression serait stimulée lors d'une réponse inflammatoire (Leifeld *et al.*, 1999). Lorsque les LSEC étaient mises en présence de concentrations physiologiques de LPS, l'expression des molécules CMH-II, CD80 et CD86 diminuait alors qu'une défectuosité dans le mécanisme de l'apprêtement des antigènes dans les endosomes de ces cellules était mis en évidence. Tous ces mécanismes présents dans le micro-environnement hépatique concourent à une réduction de la réponse immune spécifique à un antigène chez la population de lymphocytes T CD4⁺ (Knolle *et al.*, 1999b). D'autres études ont également montré que la stimulation répétée des LSEC, suite à la fixation du LPS aux récepteurs TLR4/CD14, induisait l'apparition d'un état de tolérance chez ces cellules. Ceci résulterait de la diminution de la localisation du NF- κ B (nuclear factor-kappa B) dans le noyau, provoquant une

diminution de l'expression des molécules CD54 et CD106 et contrecarrant ainsi l'adhérence subséquente des leucocytes (Uhrig *et al.*, 2005).

2.1.1.5- Les cellules T régulatrices

Les cellules T régulatrices (T_{reg}) sont caractérisées par la co-expression des molécules CD4 et CD25 (récepteur à l'IL-2), mais surtout par l'expression de la molécule FoxP3 (forkhead box P3) (Fontenot *et al.*, 2003). Les T_{reg} exercent un rôle central dans le maintien de la tolérance immunitaire puisque leur élimination *in vivo* entraîne l'apparition de plusieurs maladies auto-immunitaires ou aggrave celles induites par des pathogènes (Sakaguchi *et al.*, 2001; Bolacchi *et al.*, 2006). Les T_{reg} naturels ($CD4^+CD25^+FoxP3^+CTLA4^+GITR^+$) seraient originaires du thymus (Jordan *et al.*, 2001; Bluestone et Abbas, 2003), mais auraient une capacité de prolifération réduite suite à une activation polyclonale ou à une activation par un antigène spécifique (Jonuleit *et al.*, 2002; Vigouroux *et al.*, 2004). Au contraire, les T_{reg} dits adaptatifs seraient induits dans les tissus périphériques, notamment par l'IL-10, et présenteraient des niveaux variables du marqueur CD25 (Bluestone et Abbas, 2003). Les T_{reg} sont en mesure d'inhiber l'activation des cellules T $CD4^+CD25^+$ et des cellules T $CD8^+$ ainsi que leur production d'IL-2 subséquente (Thornton et Shevach, 1998). Pour les T_{reg} naturels, l'inhibition de l'IL-2 résulterait principalement de l'interaction cellule-cellule impliquant les molécules CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) et CD45RO (Jonuleit *et al.*, 2002; Vigouroux *et al.*, 2004; Erhardt *et al.*, 2007). À l'opposé, les T_{reg} adaptatifs exerceraient essentiellement leur action inhibitrice via la sécrétion de médiateurs immunosuppresseurs dont l'IL-10, l'IL-35 et le TGF- β (tumor growth factor β) (Weiner *et al.*, 1994; Powrie, 1995; Harber *et al.*, 2000; Vignali *et al.*, 2008). Plus précisément, il est rapporté que les cellules T régulatrices 1 ($Tr1$) produiraient de l'IL-10 alors que les cellules T helper 3 ($Th3$) seraient responsables de la sécrétion de TGF- β (Vignali *et al.*, 2008). Il est à noter que la cellule T régulatrice productrice d'IL-35 n'a pas été clairement définie.

2.1.2- La tolérance hépatique

La tolérance hépatique est un phénomène impliquant les KC, les LSEC et les DC, de même que certaines cytokines dites immunosuppressives telles que les IL-4, IL-10, TGF- β et la prostaglandine E2 (PGE₂). Cette tolérance hépatique permet au foie d'exercer ses fonctions au sein de l'organisme, mais ne doit toutefois pas empêcher l'établissement d'une réponse immunitaire lors d'une infection bactérienne ou virale. Dans le cas d'une infection par les virus HBV ou HCV, les cellules NK, les lymphocytes B, les lymphocytes T CD4⁺ et les lymphocytes T CD8⁺ doivent être en mesure d'exercer leurs rôles antiviraux et inflammatoires. Cependant, la réponse inflammatoire induite lors de l'infection doit être contrôlée par la tolérance présente dans le foie. L'équilibre entre cette tolérance immunitaire et la réponse inflammatoire pourrait déterminer en partie la gravité et la chronicité de l'infection (Holz *et al.*, 2008) (Figure 2).

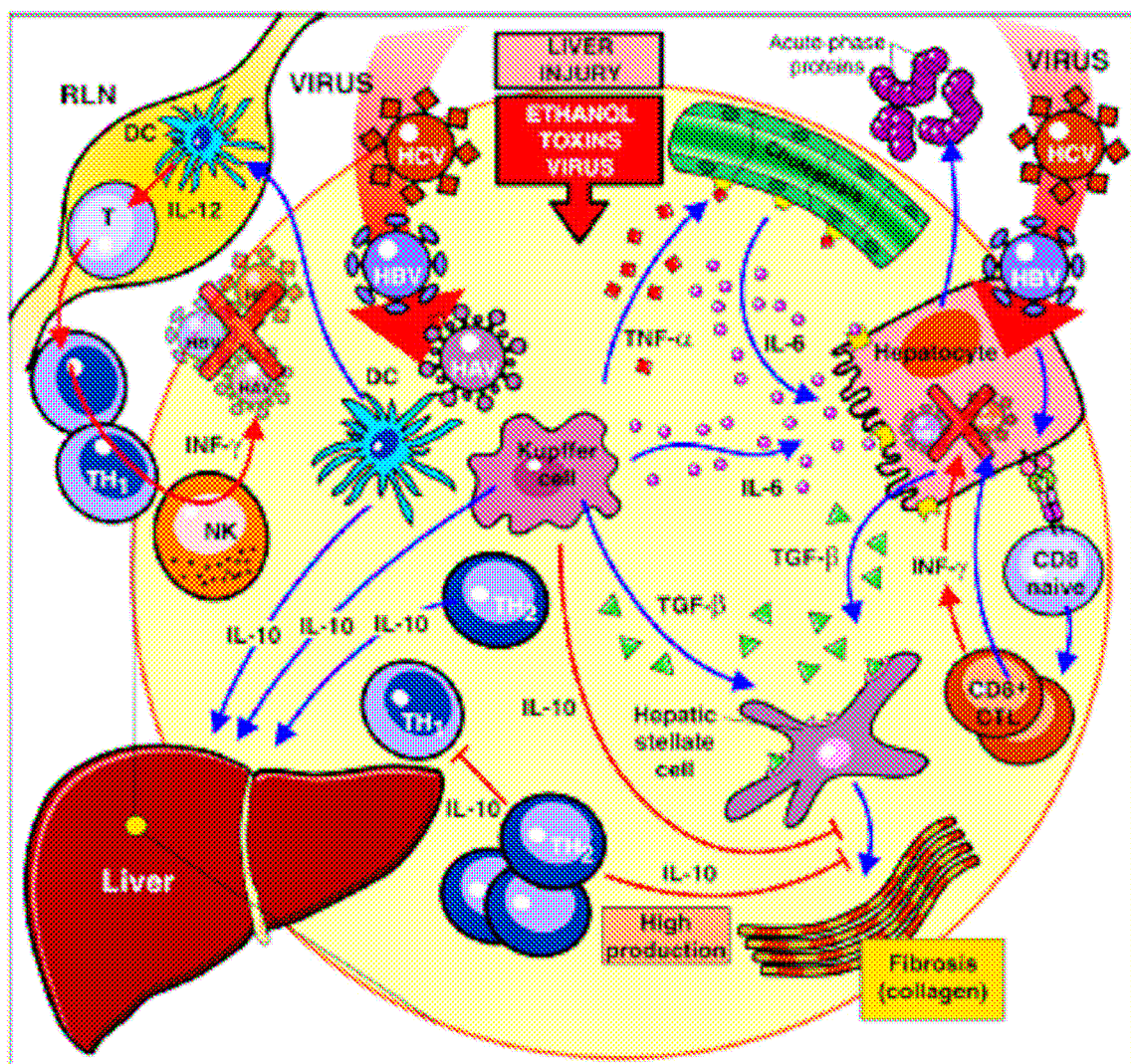


Figure 2. Résumé général de la réaction immunitaire hépatique lors d'une infection par les virus de l'hépatite humaine (Fainboim *et al.*, 2007)

Les KC peuvent activer ou inhiber les cellules T. En effet, des études *in vitro* ont démontré que la synthèse d'oxyde nitrique (NO) par ces cellules pouvait supprimer l'activation des cellules T (Roland *et al.*, 1994) alors qu'elles peuvent aussi agir à titre de CPA classiques favorisant la prolifération des cellules T et la synthèse de cytokines (Rogoff et Lipsky, 1980). Lors d'études *in vivo*, il a été démontré que la tolérance immunitaire hépatique suite à l'injection de cellules T alloréactives dans la veine porte

était sous le contrôle des KC, puisque l'élimination de ces cellules par le chlorure de gadolinium, toxique pour les KC, empêchait cet état de tolérance (Roland *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1994).

Suite à une stimulation par le LPS, par contre, les KC humaines sont en mesure de sécréter de l'IL-10 afin de diminuer la production des IL-6 et TNF- α et ainsi éviter le développement d'une réponse inflammatoire dans le foie (Knolle *et al.*, 1995). L'IL-10 produite par les KC et les T_{reg} semble également très importante dans la tolérance contre l'hépatite aiguë induite chez la souris par la concanavaline A (ConA) (Erhardt *et al.*, 2007).

L'incapacité des LSEC intrahépatiques à activer convenablement les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ serait en partie due à la présence constante de l'IL-10 et de la PGE₂. Ces cytokines produites autant par les LSEC que les KC en présence de LPS induiraient une diminution des récepteurs au mannose et de l'expression des molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CMH-II (Knolle *et al.*, 1998). L'absence des molécules de co-stimulation à la surface des LSEC serait un élément majeur dans l'induction de la tolérance des cellules T recrutées au niveau du foie.

Le TGF- β exprimé par les LSEC et KC sous des conditions physiologiques normales aurait également une action immunosuppressive (Lohse *et al.*, 1996). Bien que cette cytokine ne soit pas directement impliquée dans l'activation des cellules T CD4⁺, elle pourrait avoir un rôle dans la différenciation de ces cellules T lors de leur interaction avec les LSEC et leur entrée subséquente dans le foie (Bissell *et al.*, 1995).

Les fonctions des DC hépatiques mènent à une activation efficace des cellules T ou encore à l'induction d'une tolérance chez ces cellules. La balance entre l'induction d'une réponse immune ou d'un phénomène de tolérance se situerait dans la capacité des DC à produire soit de l'IL-12 ou de l'IL-10 respectivement (Crispe, 2003).

La tolérance induite chez les populations cellulaires T CD4⁺ et CD8⁺ via les LSEC explique en majeure partie la caractéristique immunosuppressive du foie. Même si les cellules T étaient en mesure d'être activées par les LSEC, elles se mettraient à

proliférer, mais ne pourraient pas sécréter de l'IL-2, de l'IFN- γ ou encore d'être cytotoxiques. Au contraire, les cellules T intrahépatiques se différencieraient plutôt vers un état anti-inflammatoire en favorisant la sécrétion des IL-4 et IL-10 (Knolle *et al.*, 1999a). La synthèse d'IL-10 par les cellules T affecterait alors les DC au niveau de l'expression de leurs récepteurs aux chimiokines. De façon plus spécifique, l'IL-10 augmenterait l'expression du CCR5 (chemokine (C-C motif) receptor 5), et diminuerait l'expression du CCR7 à la surface des DC, les rendant ainsi inaptés au recrutement d'autres leucocytes (D'Amico *et al.*, 2000; Takayama *et al.*, 2001).

Il a aussi été démontré que la présence de l'IL-10 et du TGF- β déterminerait le niveau d'inhibition de l'IFN- γ sécrété par les cellules T et NK. En effet, le TGF- β interférerait directement avec les cellules productrices d'IFN- γ activées au préalable par les IL-12 et IL-18. Au contraire, l'inhibition induite par l'IL-10 sur la production d'IFN- γ serait indirecte et nécessiterait la présence de monocytes (Schroder *et al.*, 2003).

2.1.3- Les observations pathologiques de l'hépatite

L'hépatite est une inflammation du foie qui résulte de plusieurs causes distinctes, dont les infections virales, les médicaments ou l'alcool. Les signes cliniques des atteintes hépatiques sont reliés à des fonctions hépatocellulaires compromises. L'examen histopathologique du foie, lors d'hépatite, peut révéler des infiltrations de lymphocytes dans les sinusoides hépatiques, l'accumulation de gras dans les hépatocytes (stéatose hépatique), des lésions vasculaires ou une cholestase (Smith *et al.*, 1972; Badizadegan *et al.*, 1998; Fraser *et al.*, 2000). L'apparition excessive de nodules lymphatiques, de centres germinatifs ou de macrophages pigmentés (indiquant l'ingestion d'hépatocytes nécrotiques) sont d'autres éléments reliés à une hépatite (Badizadegan *et al.*, 1998). L'hépatite chronique est généralement associée à l'apparition d'une fibrose, qui consiste en l'accumulation progressive et excessive d'une matrice extracellulaire tridimensionnelle composée de glycoprotéines (fibronectine, laminine, ténascine), de molécules protéiques (collagène, élastine) et de protéoglycanes (Guttierrez-Reyes *et al.*, 2007). La matrice extracellulaire peut être synthétisée par plusieurs types cellulaires

dont les cellules endothéliales, les cellules épithéliales des canaux biliaires, les hépatocytes et principalement, les cellules de Ito (Abdel-Aziz *et al.*, 1991; Bhunchet et Wake, 1992; Friedman, 1993). La fibrose peut être associée à la formation de nodules régénératifs avec ou sans hyperplasie du canal biliaire. Elle peut également entraîner une cholestase, une hypertension portale et/ou une diminution du débit sanguin hépatique (Fraser *et al.*, 2000).

Certaines enzymes sériques peuvent être testées afin de mettre en évidence des modifications irréversibles ou réversibles des fonctions hépatiques. L'alanine aminotransférase (ALT), l'aspartate aminotransférase (AST), la sorbitol déhydrogénase et l'arginase peuvent indiquer une induction enzymatique, des altérations de la perméabilité membranaire ou une nécrose hépatocellulaire. D'autres tests peuvent être utilisés afin de vérifier l'intégrité des fonctions hépatiques dont 1) la capacité de métaboliser des protéines, des lipides, des hydrates de carbone, de l'acide urique et de l'ammoniac; 2) la clairance plasmatique des anions organiques tels que les acides biliaires et la bilirubine et 3) l'évaluation du débit sanguin (Fraser *et al.*, 2000).

2.1.4- La réaction inflammatoire hépatique

2.1.4.1- L'hépatite B humaine

Que ce soit par une action directe du virus HBV ou par une activation indirecte des cellules lymphocytaires ou des CPA, l'infection par le HBV amène les cellules NK hépatiques à exercer leurs fonctions antivirales. De plus, les cellules NK peuvent activer d'autres types cellulaires et augmenter les mécanismes de défense immunitaire (Chen *et al.*, 2005a). En plus de leur activité cytotoxique, les cellules NK produisent de l'IFN- γ et du TNF- α . L'IFN- γ permet une réduction du nombre d'hépatocytes infectés tout en augmentant l'expression de la molécule de CMH-I, favorisant ainsi la reconnaissance des cellules infectées par les cellules T cytotoxiques (Chisari, 2000). L'IFN- γ produit par les cellules NK permet également l'induction du TNF- α et des IFN- α/β , inhibant la réplication du HBV (McClary *et al.*, 2000). Le virus HBV induit la libération de l'IL-12

qui est un élément activateur des cellules NK (Cavanaugh *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 2002). Cette cytokine permet aussi l'inhibition de la réplication virale suite à une activation des cellules lymphocytaires hépatiques résidentes sans nécessiter de recrutement cellulaire (Cavanaugh *et al.*, 1997). L'activité des cellules NK contre le virus HBV peut toutefois être régulée par l'IL-10, l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18 (Cai *et al.*, 1998; Monsalve-de Castillo *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2002; Kimura *et al.*, 2002a; Kimura *et al.*, 2002b). Quant aux cellules NK-T hépatiques, elles peuvent inhiber la réplication du virus HBV seulement lorsqu'elles ont été préalablement stimulées par l' α GalCer (α -galactosidécéramide). Cette suppression peut s'effectuer par la libération d'IFN- α/β ou d'IFN- γ ou encore par le recrutement de cellules NK activées (Kakimi *et al.*, 2000).

Chez les patients chroniquement infectés avec le HBV, les niveaux d'IL-12 sériques sont très élevés et corrént positivement avec la capacité d'élimination virale (Lok, 2000). Le rôle de l'IFN- γ a également été très documenté au niveau de la protection antivirale contre le HBV. Effectivement, l'IL-12 est en mesure d'inhiber la réplication du HBV via la production d'IFN- γ (Cavanaugh *et al.*, 1997). De plus, l'IL-12, en présence d'IL-18, peut activer de façon synergique la production de lymphocytes T helper 1 (Th1) spécifiques pour les antigènes du HBV et leur sécrétion subséquente d'IFN- γ (Szkardkiewicz *et al.*, 2005). Le rôle des lymphocytes T CD4⁺ helper au cours de l'hépatite chronique induite par le HBV est bien documenté (Chisari et Ferrari, 1995; Lohr *et al.*, 1995; Milich *et al.*, 1995). Les lymphocytes T CD4⁺ sont connus pour être fonctionnellement différents, c'est-à-dire qu'ils peuvent sécréter des cytokines de type Th1 (IFN- γ et IL-2; immunité cellulaire) ou de type Th2 (IL-4, IL-5 et IL-10; immunité humorale) (Mosmann et Sad, 1996). Au cours de la phase chronique de l'infection par le HBV, les cellules CD4⁺ Th1 deviendraient incapable de sécréter convenablement de l'IFN- γ lorsque mises en présence avec la protéine « core » (HBcAg) (Milich *et al.*, 1997). De plus, l'antigène « e » du HBV (HBeAg) diminuerait les mécanismes de clairance virale en favorisant une production de cytokines anti-inflammatoires (type Th2) (Milich *et al.*, 1997). Bien que les cytokines de type Th1 soient impliquées dans l'élimination virale, les niveaux élevés des IL-2, IL-6, IL-18, IFN- γ et TNF- α sériques

chez les patients infectés chroniquement seraient responsables des dommages tissulaires hépatiques (Falasca *et al.*, 2006).

2.1.4.2- L'hépatite C humaine

Il a été montré qu'au cours de l'infection par le HCV, la réponse immunitaire innée favorisait une forte augmentation des niveaux des IL-1, IL-6 et TNF- α , entraînant la libération des 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). De faibles niveaux d'IL-6 seraient, au contraire, associés à l'élimination virale (Barrett *et al.*, 2003). En plus de provoquer une augmentation de la perméabilité vasculaire, le TNF- α libéré lors de l'infection chronique par le HCV augmenterait les risques d'apoptose cellulaire et rendrait les hépatocytes encore plus vulnérables à l'action du TNF- α (Vidigal *et al.*, 2002; Lio *et al.*, 2003). Ainsi, puisque le traitement par la ribavirine diminue la production de TNF- α par les DC matures infectées par le HCV, les dommages histologiques seraient plus élevés chez des patients infectés qui n'auraient pas été adéquatement traités (Neuman *et al.*, 2002; Barnes *et al.*, 2004). Les niveaux hépatiques d'IL-8 sont également très élevés lors de la réponse inflammatoire induite par le HCV. Les LSEC en seraient la source et provoqueraient un recrutement important de leucocytes dans le foie (Shimoda *et al.*, 1998; Hoshida *et al.*, 2005).

Plusieurs études ont mises en évidence le rôle des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ T dans le contrôle de l'infection par le HCV. Cependant, les réponses immunitaires médiées par les cellules T sont significativement diminuées au cours de la phase chronique de l'infection, suggérant que ces désordres cellulaires soient responsables de la persistance virale (Eisen-Vandervelde *et al.*, 2004a). L'activation de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques au HCV semble être critique pour l'élimination des cellules infectées. Toutefois, ces cellules cytotoxiques sont fortement diminuées dans le foie et en périphérie chez les patients chroniquement infectés (Eisen-Vandervelde *et al.*, 2004b). Cette suppression de cellules T cytotoxiques suggèrent que le HCV pourrait

interférer avec l'activation et la différenciation des cellules T CD4⁺ helper, permettant ainsi l'établissement d'une infection chronique (Eisen-Vandervelde *et al.*, 2004b). Au cours de la réponse immunitaire adaptative induite suite à une infection par le HCV, l'IL-2, l'IFN- γ et le TNF- α participeraient à l'élimination virale (Guidotti et Chisari, 2001). Par contre, la protéine « core » du HCV peut inhiber la synthèse et la production de l'IL-12, provoquant ainsi une diminution de la sécrétion d'IFN- γ par les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) (Eisen-Vandervelde *et al.*, 2004b). Il a été montré que les niveaux d'IL-12 sériques augmentaient chez des patients traités avec du polyéthylène glycol (PEG)-IFN- α et de la ribavirine, suggérant que l'IL-12 jouerait un rôle essentiel dans la production de cytokines de type Th1 et le contrôle de l'infection virale (Amaraa *et al.*, 2002).

Les cellules NK semblent être impliquées dans l'élimination du virus HCV au cours de la phase aiguë. En effet, la première ligne de défense contre l'infection par le virus HCV dépend des cellules NK et NK-T. Au cours de l'infection, ces cellules sont augmentées dans le foie et l'expression de l'IFN- α y est également très élevée, comparativement aux autres organes lymphoïdes (Kanto et Hayashi, 2006). Les DC peuvent normalement activer les cellules NK via la production de l'IL-12, de l'IL-18 ou de l'IFN- α (Jinushi *et al.*, 2003). Cette activation augmente la production d'IFN- γ par les cellules NK et l'inhibition subséquente de la réplication virale (Guidotti et Chisari, 2001; Frese *et al.*, 2002). Cependant, les DC provenant de patients infectés par le HCV ne sont pas en mesure d'activer convenablement les cellules NK (Jinushi *et al.*, 2003). Ainsi, la perte fonctionnelle des DC et des cellules NK serait responsable de l'infection persistante du HCV chez les patients et ce, malgré la présence élevée d'IFN- α dans le foie (Thimme *et al.*, 2001; Thimme *et al.*, 2002). De plus, il est connu que la protéine d'enveloppe E2 du virus HCV est en mesure de se fixer sur le récepteur CD81 présent à la surface des cellules NK provoquant ainsi l'inhibition de leurs fonctions (Crotta *et al.*, 2002).

2.2- Les cellules NK et NK-T

2.2.1- Caractéristiques des cellules NK

Les cellules NK sont des cellules larges et granuleuses, qui dérivent des cellules souches hématopoïétiques et qui mûrissent dans la moelle osseuse (Freud et Caligiuri, 2006). Cependant, certaines études suggèrent l'existence de précurseurs de cellules NK dans le thymus, la rate et les ganglions lymphatiques (Ikawa *et al.*, 2001; Rosmaraki *et al.*, 2001). Le micro-environnement de la moelle osseuse contient les cellules stromales supportant la maturation des cellules NK et est la source majeure des cytokines impliquées dans leur différenciation (Ogasawara *et al.*, 1998). Chez la souris, les précurseurs des cellules NK expriment la molécule CD122 qui est la sous-unité β commune aux récepteurs à l'IL-2 et l'IL-15. Par cette sous-unité commune, l'IL-15 peut fournir les signaux nécessaires à la maturation des cellules NK (Yoon *et al.*, 2007). Malgré que l'IL-15 soit essentielle à la génération des cellules NK (Carson *et al.*, 1994; Budagian *et al.*, 2006), la transition des cellules hématopoïétiques aux cellules précurseurs ne nécessite pas cette cytokine (Vosshenrich *et al.*, 2005), ni l'IL-2 par ailleurs (Yoon *et al.*, 2007). La chaîne γ commune aux récepteurs des IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 et IL-21 serait également essentielle aux cellules NK (Vosshenrich et Di Santo, 2002). L'IL-2 influencerait les cellules NK dans leur différenciation et leurs fonctions (Schimpl *et al.*, 1994) alors que l'IL-4 complèterait la différenciation des cellules NK humaines *in vitro* (Loza et Perussia, 2001; Loza *et al.*, 2002). L'IL-7 serait impliquée dans la génération des cellules NK ou dans leur maintenance dans les organes lymphoïdes secondaires (Vosshenrich *et al.*, 2005). Bien qu'elle n'ait été que récemment connue, l'IL-21, tout comme l'IL-15, permettrait l'activation des cellules NK en favorisant la production d'IFN- γ et leur activité cytotoxique (Strengell *et al.*, 2002; Brady *et al.*, 2004).

En plus de promouvoir la différenciation et la maturation des cellules NK, certaines cytokines protègent les cellules NK contre l'apoptose naturelle ou induite. En effet, l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15, mais non pas l'IL-12, sont en mesure de protéger les cellules NK contre l'apoptose en augmentant l'expression de Bcl-2 (Armant *et al.*, 1995;

Carson *et al.*, 1997; Cooper *et al.*, 2002). D'autres études ont rapporté que la survie des cellules NK ne dépendait pas des cytokines macrophagiques (IL-1 β , IL-10, IL-12 et TNF- α) ou même des cytokines utilisant la chaîne commune γ_c comme voie de signalisation (IL-4, IL-7, IL-9 et IL-13) (Carson *et al.*, 1997).

À la suite de leur maturation, les marqueurs NK1.1, DX5, CD94-NKG2 et Ly49 apparaissent à la surface des cellules NK en même temps que leur fonction cytotoxique (Williams *et al.*, 1999). Parmi ces marqueurs de surface, certaines protéines membranaires possédant des domaines « lectin-like » telles que les molécules Ly49, NKG2D et CD94/NKG2 peuvent être retrouvées chez la souris (Colonna, 1997; Vance *et al.*, 1998). Les molécules de chacune de ces familles de récepteurs possèdent une forme activatrice ou inhibitrice, via la présence de ITAMs (immunoreceptor tyrosine-base activation motif) ou de ITIMs (immunoreceptor tyrosine-base inhibition motif) respectivement (Lanier *et al.*, 1998). Les cellules NK reconnaissent plusieurs cellules-cibles via leurs propres récepteurs, mais principalement les cellules infectées et les cellules tumorales exprimant faiblement le CMH-I (Ljunggren et Karre, 1985). Ainsi, les récepteurs activateurs sont essentiels à l'induction de l'activité cytotoxique et à la production de cytokines par les cellules NK. De plus, ces fonctions peuvent être régulées négativement par les récepteurs associés aux ITIMs. Effectivement, dans le cas où les cellules-cibles exprimeraient adéquatement la molécule CMH-I, ces dernières deviendraient résistantes à la lyse cytotolytique par les cellules NK (Yoon *et al.*, 2007). Cependant, de 10% à 20% des cellules NK chez l'humain et la souris ne possèderaient pas les récepteurs inhibiteurs pour les molécules CMH-I. Ainsi, ces cellules NK seraient potentiellement cytotoxiques pour les cellules dites normales pour l'hôte (Fernandez *et al.*, 2005; Colley *et al.*, 2007).

2.2.2- Caractéristiques des cellules NK-T

Les cellules NK-T représentent un faible pourcentage de la population des lymphocytes T (<1%). Ces cellules sont toutefois davantage présents dans le foie qu'au niveau de la rate, des ganglions lymphatiques et du sang (Jukes *et al.*, 2007). Les

cellules NK-T incluent les sous-populations CD4⁺, CD8⁺ et double-négatives (DN) (Ohteki et MacDonald, 1994; Hammond *et al.*, 1998), mais l'origine et le développement des cellules NK-T demeurent encore controversés. Certains groupes proposent que les cellules NK-T peuvent se développer en absence de thymus (Kikly et Dennert, 1992; Ohteki *et al.*, 1992), probablement dans la moelle osseuse ou le foie (Makino *et al.*, 1993; Sato *et al.*, 1999), alors que d'autres études démontrent que des souris athymiques ne sont pas en mesure de produire des cellules NK-T (Levitsky *et al.*, 1991; Bendelac, 1995; Hammond *et al.*, 1998). Une étude aurait démontré que les cellules NK-T CD8⁺ seraient présentes dans tous les tissus à l'exception du thymus, alors que les cellules NK-T CD4⁺ et DN seraient thymo-dépendantes pour leur développement (Hammond *et al.*, 1999). Les cellules NK-T expriment des marqueurs de surface spécifiques aux cellules NK soient les molécules NK1.1, CD122, CD16, DX5 et Ly49. Cependant, les cellules NK-T activées montrent le phénotype CD44^{high}, CD69⁺, CD62L^{low} (Hammond *et al.*, 1999).

Les cellules NK-T reconnaissent des glycolipides présentés sur une molécule non conventionnelle de CMH-I, soit le récepteur CD1d. Cependant, il a été démontré que les fonctions des cellules NK-T pouvaient être restreintes à la molécule CD1d (« CD1d-restricted ») ou indépendantes de ce récepteur (« CD1d-unrestricted »). De plus, il a été suggéré que les cellules NK-T « CD1d-unrestricted » étaient impliquées dans l'activation de la réponse immunitaire innée, au contraire des cellules NK-T « CD1d-restricted » qui activeraient plutôt la réponse immune adaptative (Giroux et Denis, 2005). Par ailleurs les cellules NK-T possèdent normalement un répertoire très limité concernant leur récepteur TCR (T cell receptor). Ces cellules sont, par conséquent, appelées semi-invariantes ou iNK-T. En effet, chez la souris, leur molécule de TCR est composée seulement des chaînes V α 14-J α 18 associées aux chaînes V β 8.2, V β 7 ou V β 2 (Jukes *et al.*, 2007; Stronge *et al.*, 2007).

2.2.3- Cytokines libérées par les cellules NK et NK-T

Au cours des dernières années, certaines études ont suggéré l'existence de cellules NK humaines et murines possédant des fonctions plus spécialisées : les cellules NK « helper » de type 1 et 2, les cellules NK régulatrices, les cellules NK cytotoxiques et les cellules NK présentatrices d'antigènes (Perussia et Loza, 2003; Kimura et Nakayama, 2005; Spits et Lanier, 2007). Cependant, il n'en reste pas moins que les cellules NK peuvent sécréter une variété de cytokines telles que l'IFN- γ , l'IL-1 β , l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-6 (Saito *et al.*, 1993). Toutefois, la production d'IFN- γ par les cellules NK demeure un des mécanismes les plus étudiés puisque cette cytokine est souvent présente lors d'infection par des pathogènes.

La production d'IFN- γ par les cellules NK peut être induite ou augmentée par plusieurs cytokines dont les IL-2, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 et IFN- γ (Cai *et al.*, 1998; Gately *et al.*, 1998; Lauwerys *et al.*, 1999; Strengell *et al.*, 2003). Il été démontré que l'IL-21 pouvait augmenter de façon synergique la production d'IFN- γ par les cellules NK en combinaison avec l'IL-15 ou l'IL-18 (Strengell *et al.*, 2003). De plus l'IL-10, en combinaison avec l'IL-18, augmenterait la prolifération des cellules NK ainsi que leur activité cytotoxique et leur production d'IFN- γ (Cai *et al.*, 1998). Toutefois, c'est l'action synergique des IL-12 et IL-18 qui favorisent une meilleure prolifération des cellules NK spléniques. De plus, contrairement à l'IL-2 et à l'IL-15, les cellules NK spléniques traitées simultanément avec les IL-12 et IL-18 sont en mesure de sécréter de grandes quantités d'IFN- γ , d'IL-3, d'IL-6 et de TNF- α , ce qui n'est pas le cas lorsque les IL-12 ou IL-18 sont utilisées seules (Lauwerys *et al.*, 1999). Spécifiquement, l'IL-18 augmente fortement la phosphorylation des ERK-1 (extracellular signal-regulated kinase) MAPK, ERK-2 MAPK et STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), mais pas de la STAT5. Bien que l'IL-18 ne soit pas en mesure de stimuler la production d'IFN- γ par les cellules en lignée NK92, elle induit tout de même l'expression des ARNm (ARN messenger) codant pour l'IFN- γ (Kalina *et al.*, 2000). Il a également été démontré chez les cellules NK sanguines humaines que, au contraire de l'IL-12, l'IL-18 activait fortement la p38 MAPK. Par

ailleurs, le niveau d'expression de l'ARNm codant pour l'IFN- γ était en fonction du niveau de phosphorylation de la p38 MAPK. De plus, l'ajout d'un inhibiteur spécifique de la p38 MAPK provoquait une déstabilisation de cet ARNm, notamment au niveau de l'UTR (untranslated region) à l'extrémité 3' (Mavropoulos *et al.*, 2005).

Les cellules NK peuvent exprimer à leur surface des récepteurs Ly49 autant activateurs (Ly49D et Ly49H) qu'inhibiteurs (Ly49A, Ly49C, Ly49G et Ly49I) (Yokoyama, 1995; Long *et al.*, 1997; Takei *et al.*, 1997). Cependant, le domaine inhibiteur prédomine toujours sur le domaine activateur et influence les fonctions des cellules NK (Ortaldo *et al.*, 2006). Or, une co-stimulation synergique entre le récepteur activateur Ly49D et les cytokines IL-12 et IL-18 permet de contrer l'effet inhibiteur du récepteur Ly49G2 et ce, autant *in vivo* qu'*in vitro*. Cette activation synergique, régulée par les domaines ITAMs du récepteur Ly49D, provoque une importante production d'IFN- γ par les cellules NK (Ortaldo et Young, 2003; Ortaldo *et al.*, 2006). Par ailleurs, les voies p38 et ERK MAPK seraient impliquées dans cette production synergique d'IFN- γ en augmentant l'ARNm codant pour l'IFN- γ au niveau nucléaire et cytoplasmique, sans toutefois affecter la demi-vie de cet ARNm (Ortaldo *et al.*, 2006). Seulement 15 minutes de pré-traitement avec l'IL-12 sont nécessaires pour obtenir une réponse synergique maximale, suggérant que le signal induit par cette cytokine est rapide et immédiat (Ortaldo *et al.*, 2006). Bien que l'activation de la production d'IFN- γ par des cellules NK stimulées avec les IL-12 et IL-18 soit un mécanisme très important dans le contrôle de certaines pathologies (Moreira *et al.*, 2004), il est important que cette réponse soit adéquatement contrôlée. Il a été montré que la PGE₂ (0,1 à 1,0 μ M) pouvait supprimer la synthèse synergique d'IFN- γ par les lignées cellulaires NK 5E3 et 5E6. En fait, cette inhibition serait provoquée par la liaison de la PGE₂ sur le récepteur EP₂, mais non pas sur l'EP₁ ou l'EP₃, et ne régulerait pas l'expression de l'ARNm codant pour le récepteur à l'IL-12. Il a alors été suggéré que la PGE₂ agirait directement par la voie de signalisation relative au récepteur EP₂ en affectant le métabolisme de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC). La PGE₂ peut donc limiter la réponse immunitaire innée en supprimant directement la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK (Walker et Rotondo, 2004).

Le rôle des cellules NK-T dans l'immunité n'est pas encore clairement défini. Certaines études proposent des rôles bénéfiques alors que d'autres suggèrent des actions aggravantes de la part de ces cellules. Lorsque les cellules NK-T sont activées via leur TCR, elles libèrent de grandes quantités de cytokines de type Th1 (IFN- γ et TNF- α) ou de type Th2 (IL-4, IL-10 et IL-13) (Stronge *et al.*, 2007). En fait, deux modèles d'activation des cellules NK-T ont été proposés au cours des dernières années. Le premier est basé sur l'hypothèse que les cellules NK-T comprendraient deux populations distinctes soient les « Th1-like » et « Th2-like », dépendamment des cytokines produites par ces cellules et de la réponse immunitaire induite. Le second modèle propose que les cellules NK-T constitueraient une population homogène qui adopterait différents phénotypes fonctionnels selon le micro-environnement immédiat et selon l'affinité pour le TCR des peptides présentés sur la molécule CD1d (Godfrey et Kronenberg, 2004; Jukes *et al.*, 2007). Plus précisément, il a été montré que les cellules NK-T CD4⁺ et DN provenant du thymus ou de la rate avaient des capacités similaires à libérer de l'IFN- γ et de l'IL-4 lorsque stimulées par un anticorps anti-CD3. Cependant, les cellules CD4⁺ étaient de meilleurs producteurs que les cellules DN. Au contraire, les cellules NK-T CD8⁺ spléniques activées n'étaient pas en mesure de produire de l'IL-4. Finalement, bien que les cellules NK-T thymiques activées par l'anti-CD3 puissent sécréter de l'IFN- γ , les sous-populations de cellules NK-T spléniques n'en étaient pas capables. Ces résultats indiquent des différences fonctionnelles entre les sous-populations de cellules NK-T selon leur localisation (Hammond *et al.*, 1999).

2.2.4- Activité cytotoxique des cellules NK et NK-T

Lorsqu'elles sont stimulées, les cellules NK exercent leur activité cytotoxique via la sécrétion de perforines et de granzymes ou encore via la liaison de leur ligand Fas (FasL ou CD95L) sur la molécule Fas (CD95) exprimée à la surface des cellules-cibles. Cette propriété leur permet d'induire l'apoptose chez des cellules transformées ou infectées par des virus (Nagata, 1997; Maki *et al.*, 2001). Plusieurs cytokines dont l'IL-2, l'IL-12 et l'IL-18 peuvent, seules ou en combinaison, augmenter les fonctions

cytolytiques des cellules NK. La fonction cytotoxique des cellules NK activées par l'IL-12 serait dépendante de l'activité des perforines (Cui *et al.*, 1997; Kawamura *et al.*, 1998; Hashimoto *et al.*, 1999) alors que l'IL-18 augmenterait plutôt l'expression de FasL à la surface des cellules effectrices (Tsutsui *et al.*, 1996; Hashimoto *et al.*, 1999).

Les voies d'activation intracellulaires p38 et ERK MAPK sont importantes dans l'activité cytotoxique des cellules NK. En effet, lors de la reconnaissance des cellules dites sensibles par les cellules NK, la voie ERK-2 MAPK est induite en moins de 5 minutes (Wei *et al.*, 2000). En fait, cette voie peut être impliquée dans la cytotoxicité naturelle (reconnaissance des cellules dites sensibles) ou dans le mécanisme d'ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps) impliquant les récepteurs Fc γ RIII (Trotta *et al.*, 1996; Wei *et al.*, 1998; Trotta *et al.*, 1998). Ces mécanismes de cytotoxicité des cellules NK nécessitent également l'activation de la voie de signalisation intracellulaire p38 MAPK. Cependant, l'ajout d'une concentration optimale d'un inhibiteur spécifique de la p38 MAPK ne permet qu'une inhibition partielle de la cytotoxicité, suggérant que les fonctions des cellules NK sont à la fois p38 MAPK-dépendantes et p38 MAPK-indépendantes (Chini *et al.*, 2000). De plus, la p38 MAPK serait impliquée dans l'induction de la cytotoxicité des cellules NK activées par des ARN double brin (ARNdb). En effet, la liaison de ces ARNdb à des récepteurs TLR3 favoriserait l'augmentation de la cytotoxicité naturelle et le mécanisme d'ADCC chez les cellules NK tout en permettant une production importante d'IFN- γ (Pisegna *et al.*, 2004).

L'inhibition de l'activité cytotoxique des cellules NK s'effectue généralement lors de la reconnaissance d'une molécule de CMH-I par un récepteur inhibiteur, la molécule KIR (killer-cell inhibitory receptor). Ainsi, l'absence de CMH-I à la surface de la cellule-cible la rend sensible à la cytotoxicité naturelle des cellules NK. Or, cette cytotoxicité cellulaire peut être empêchée par une interaction homophile entre deux molécules CEACAM (carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule). De plus, la force de l'inhibition corrèlerait avec le niveau d'expression de cette molécule (Markel *et al.*, 2002a). Il a également été déterminé que les interactions homophiles entre deux

molécules CEACAM pouvaient empêcher la lyse naturelle des cellules provenant de patients déficients pour la protéine TAP, impliquée dans la présentation antigénique via la molécule CMH-I (Markel *et al.*, 2004b). Donc, l'inhibition de l'activité cytotoxique des cellules NK pourrait prévenir l'attaque de cellules dites saines chez des patients atteints de maladies auto-immunitaires.

La cytotoxicité induite par les cellules NK-T dépend de trois différents mécanismes. Ces cellules peuvent sécréter dans l'espace intercellulaire des perforines et des granzymes, une fois en contact avec la cellule-cible. Ces enzymes vont perforer la membrane cellulaire et induire l'apoptose (Kagi *et al.*, 1994; Lowin *et al.*, 1994). Également, les cellules NK-T peuvent induire l'apoptose via la fixation de la molécule FasL, exprimée par les cellules NK-T, sur la molécule Fas, exprimée sur la cellule-cible (Rouvier *et al.*, 1993; Kagi *et al.*, 1994; Lowin *et al.*, 1994). Finalement, le TNF- α produit par les cellules NK-T peut induire à long terme une cytotoxicité sur les cellules-cibles en s'y liant à ses récepteurs spécifiques (Lee *et al.*, 1996). Il a été rapporté que les cellules NK-T pouvaient tuer les cellules-cibles n'exprimant que la molécule CD1d en moins de 4 heures. Cette cytotoxicité était médiée par les perforines/granzymes, mais était plus efficace via l'interaction Fas/FasL. En conséquence, les cellules n'exprimant pas la molécule CD1d pouvaient, à court terme, devenir résistantes à la cytotoxicité des cellules NK-T (Gansuud *et al.*, 2002). Cependant, lorsque les cellules NK-T étaient mises en contact avec les cellules-cibles pour une plus longue période de temps (20 heures), ces cellules NK-T étaient en mesure d'induire l'apoptose des cellules-cibles indépendamment de l'expression du CD1d. Bien que le mécanisme des perforines/granzymes était toujours efficace durant cette période, le TNF- α y jouait également un rôle très efficace à long terme (Gansuud *et al.*, 2002). Il est à noter que l'IL-18 peut augmenter l'activité des cellules NK-T tout aussi bien que celle des cellules NK. Cependant, la cytotoxicité des cellules NK-T favorisée par l'IL-18 serait médiée par l'interaction Fas/FasL et serait indépendante des perforines/granzymes ou du TNF- α (Dao *et al.*, 1998).

Table I. Résumé des mécanismes de cytotoxicité des cellules NK et NK-T.

| | Mécanismes d'action | Induction |
|----------------------|----------------------------|---|
| Cellules NK | - Perforines/Granzymes | - Cytokines |
| | - Fas/Ligand Fas | - Fc γ RIII (ADCC) |
| | | - CMH-I/KIR |
| | | - TLRs |
| Cellules NK-T | - Perforines/Granzymes | - Cytokines |
| | - Fas/Ligand Fas | - Présence de CD1d à la surface des cellules-cibles |
| | - TNF- α | |

2.2.5- Les cellules NK et NK-T intrahépatiques

Comparativement aux autres organes lymphoïdes, la composition des cellules immunitaires du foie en diffère de par sa large proportion de cellules NK, de cellules NK-T et de lymphocytes T- $\gamma\delta$. Les lymphocytes B sont plutôt sous-représentés alors que les lymphocytes T- $\alpha\beta$ sont davantage de nature effectrice ou mémoire. Comme les cellules NK en général représentent un fort pourcentage des lymphocytes hépatiques (Norris *et al.*, 1998), il est suggéré que le foie serait un site de reconnaissance antigénique précoce où la réponse immunitaire innée posséderait un rôle particulièrement important.

Les cellules NK hépatiques sont de larges cellules granuleuses présentes dans les sinusoides hépatiques. Leurs fonctions sont régulées par des récepteurs activateurs ou inhibiteurs de même que par les cytokines présentes dans le micro-environnement hépatique, dont l'IFN- γ , l'IL-2, l'IL-12 et l'IL-15 (Doherty et O'Farrelly, 2000). Les cellules NK hépatiques joueraient un rôle important dans le recrutement des lymphocytes T dans le foie. Effectivement, au cours de l'infection par le MCMV

(cytomégalo virus murin), la production d'IFN- α/β et de MIP (Macrophage inflammatory protein)-1 α favoriserait le recrutement des cellules NK dans le foie et l'induction de la production de l'IFN- γ (Salazar-Mather *et al.*, 1998; Salazar-Mather *et al.*, 2000). Les cellules NK intrahépatiques répondent différemment à l'IL-12 et à l'IL-18 dans la production d'IFN- γ et la défense antivirale contre le LCMV (virus de la chorioméningite lymphocytaire) ou le MCMV, comparativement aux cellules NK des autres organes lymphoïdes (Pien et Biron, 2000; Pien *et al.*, 2000). Ces cellules produiraient de l'IFN- γ entraînant la libération de la chimiokine CXCL9 (chemokine (C-X-C motif) ligand 9) par les hépatocytes et/ou les LSEC et, subséquemment, le recrutement des cellules T dans le foie (Itoh *et al.*, 2001). D'autres études démontrent que les cellules NK et NK-T expriment à leur surface différents récepteurs pour les chimiokines, dont les CXCR3 (chemokine (C-X-C motif) receptor 3), CXCR4, CXCR6 et CCR5, leur permettant d'être recrutées au niveau du foie (Shields *et al.*, 1999; Campbell *et al.*, 2001; Johnston *et al.*, 2003). Ce recrutement est aussi médié par un mécanisme dépendant de l'expression de la molécule LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) (Emoto *et al.*, 1999; Emoto *et al.*, 2000). Par ailleurs, le niveau de cellules NK dans le foie, au cours d'une infection virale, dépend du recrutement de ces cellules depuis les organes lymphoïdes périphériques de même qu'à la capacité de la moelle osseuse à produire des cellules NK matures (Moore *et al.*, 1996; Puzanov *et al.*, 1997).

L'activation des KC par le poly I:C (ARNdb synthétique), via la molécule TLR3, peut entraîner l'accumulation et l'activation des cellules NK dans le foie (Dong *et al.*, 2004). Plus précisément, le poly I:C pourrait directement augmenter l'expression de la molécule TLR3 chez les cellules NK hépatiques ou encore favoriser la sécrétion d'IL-12 par les CPA hépatiques et activer subséquemment les cellules NK (Schmidt *et al.*, 2004). Cette activation peut toutefois entraîner des dommages tissulaires et de la nécrose hépatique parallèlement à l'augmentation des niveaux de ALT et AST (Dong *et al.*, 2007). Cette cytotoxicité serait médiée par la présence de la molécule TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), exprimée à la surface des cellules NK, et l'apoptose des hépatocytes (Ochi *et al.*, 2004). L'action des perforines et de FasL, mais non pas de

l'IFN- γ , serait également importante dans les dommages tissulaires hépatiques induits par l'activation de TLR3 dans le foie (Dong *et al.*, 2007). Finalement, des études ont démontré que les cellules NK hépatiques pouvaient contrôler la croissance des hépatocytes et inhiber la régénération du foie (Tanaka *et al.*, 1993; Itoh *et al.*, 1988).

Pour ce qui est des cellules NK-T intrahépatiques, elles sont détectables par les tétramères de CD1d et sont subdivisées en deux catégories : les cellules NK-T classiques exprimant un TCR- $\alpha\beta$ et les cellules NK-T non classiques exprimant un TCR- $\gamma\delta$ ou la molécule CD8⁺ (Klugewitz *et al.*, 2004). Les cellules NK-T hépatiques expriment faiblement la molécule de TCR et possèdent des récepteurs communs aux cellules NK dont les molécules NK1.1, Ly49 et le récepteur β à l'IL-2 (Doherty et O'Farrelly, 2000). Ces cellules ont la capacité de produire des cytokines de type Th1 ou Th2 suite à leur activation via leur TCR. Elles produisent généralement de l'IL-4 impliquée dans l'initiation de la réponse Th2 et dans la commutation isotypique des anticorps, mais peuvent aussi sécréter de l'IFN- γ , du TNF- α , de l'IL-2, de l'IL-5 et de l'IL-10 (Doherty et O'Farrelly, 2000). Suite à la stimulation par l'IL-2 ou l'IL-12, les cellules NK-T peuvent exercer une forte activité cytotoxique (Takeda *et al.*, 1996; Cui *et al.*, 1997).

Des études ont démontré que les souris CD1d^{-/-} étaient résistantes à l'hépatite induite par la ConA, suggérant l'implication des cellules NK-T dans cette pathologie (Takeda *et al.*, 2000; Kaneko *et al.*, 2000). Les dommages tissulaires et l'apoptose induits par les cellules NK-T seraient médiés par l'IFN- γ , le TNF- α et FasL (Kusters *et al.*, 1996; Kusters *et al.*, 1997; Tagawa *et al.*, 1998). Cependant, l'IL-15 protégerait contre l'hépatite induite par la ConA en inhibant la sécrétion d'IL-4 et d'IL-5 par les cellules NK-T, diminuant par le fait même le recrutement d'éosinophiles dans le foie (Li *et al.*, 2006). De plus, l'absence de la molécule CCR5 à la surface des cellules NK-T favoriserait la production d'IL-4 par ces cellules et le développement d'une hépatite fulminante (Ajuebor *et al.*, 2005). Les cellules NK-T sont également impliquées dans d'autres maladies du foie dont l'hépatite induite par l' α GalCer. Ces cellules sécrèteraient alors de l'IL-2, de l'IL-4, de l'IL-6, du TNF- α et de l'IFN- γ . Bien que le TNF- α soit responsable de l'augmentation de l'expression de FasL à la surface des

cellules NK-T, l'IFN- γ exercerait plutôt un rôle protecteur durant la maladie (Biburger et Tiegs, 2005). Finalement, les cellules NK-T joueraient un rôle négatif dans la régénération du foie en sécrétant de l'IFN- γ et du TNF- α (Dong *et al.*, 2007).

2.3- Les coronavirus

2.3.1- Historique

Les coronavirus furent isolés pour la première fois en 1937 dans des cas de bronchites aviaires (Schalk et Hawn, 1931). Des virus de structure semblable ont ensuite été isolés et cultivés à partir de prélèvements obtenus de patients souffrants de maladies respiratoires et de fièvre (Tyrrell et Bynoe, 1965). Ainsi, en 1966, Hamre et Procknow (1966) ont travaillé sur la caractérisation de 5 nouveaux agents infectieux et l'un d'eux, la souche 229E, devint le prototype des coronavirus humains (HCoV). Au cours des années suivantes, Tyrrell et Almeida ont identifié d'autres souches morphologiquement semblables, soient le virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) et le virus de l'hépatite murine (MHV) (Berry *et al.*, 1964; Tyrrell et Almeida, 1967). Toujours en 1967, deux souches de coronavirus humains, les virus OC38 et OC43, ont été isolées par McIntosh *et al.* (1967). Ces virus avaient la particularité de croître dans les cerveaux de souris et de favoriser l'hémadsorption des érythrocytes de souris et de rat lorsqu'ils étaient cultivés dans certaines lignées cellulaires (Kapikian, 1975).

Le nom de « Coronavirus » pour ces différents virus fut adopté pour la première fois en 1968 à cause de leur caractéristique morphologique unique observable en microscopie électronique, soit la disposition de leurs protéines de surface sous forme de pétales ou encore de couronne (Nature, 1968). Ce ne fut toutefois qu'en 1975 que le « International Committee on the Taxonomy of Viruses » (ICTV) accepta les coronavirus comme étant une famille indépendante des autres virus : la famille des *Coronaviridae* (Tyrrell *et al.*, 1975; Tyrrell *et al.*, 1978). Au début des années 1980, une autre classification fut proposée. Effectivement, les torovirus découverts par Weiss et Woode présentaient une morphologie quelque peu différente des coronavirus, mais

possédaient un génome et une réplication très similaire à ces derniers (Horzinek *et al.*, 1987). Ainsi, un deuxième genre fut inclus dans la famille des *Coronaviridae*, soit celui des *Torovirus*, le premier genre étant celui des *Coronavirus* (Cavanagh et Horzinek, 1993). À ce jour, la famille des *Coronaviridae* fait partie de l'ordre des *Nidovirales*, dans lequel fait également partie la famille des *Arteriviridae*, un autre groupe de virus montrant des similitudes dans l'organisation génomique avec les coronavirus (Cavanagh *et al.*, 1997).

2.3.2- Immunopathologie inflammatoire induite par les coronavirus

La plupart des coronavirus se répliquent en premier lieu dans les cellules épithéliales des tractus digestif ou respiratoire, puis se disséminent dans l'organisme pour causer différentes maladies, telles que des entérites, des hépatites, des maladies respiratoires et des encéphalites (McIntosh, 1974). Jusqu'en 2003, les coronavirus humains, tels que les HCoV-229E et HCoV-OC43, furent considérés comme des agents infectieux provoquant des problèmes respiratoires avec peu de mortalité. Cependant, l'implication des coronavirus dans les maladies de type neurologique ou entérique, particulièrement chez les nouveau-nés, n'a été reconnue que plus tardivement et était basée sur l'observation dans le tissu cérébral de particules virales en microscopie électronique ressemblant fortement à des coronavirus (Gerna *et al.*, 1985; Payne *et al.*, 1986).

Chez la plupart des espèces animales et aviaires, plusieurs coronavirus sont connus pour induire différentes pathologies. Cependant, dans le modèle murin, le plus connu et le plus étudié est le virus MHV, ce dernier possédant des tropismes et des niveaux de virulence variant selon les sérotypes. Selon la nature de la souche virale et des composantes génétiques de l'hôte, le MHV peut induire des entérites (MHV-Y et MHV-R1), des problèmes neurologiques (MHV-A59, MHV-JHM, MHV2 et MHV3) et/ou des hépatites (MHV-A59, MHV2 et MHV3) (Dubois-Dalcq *et al.*, 1982; Compton *et al.*, 1993; Stohlman *et al.*, 1998). Le MHV3 est considéré comme le plus virulent des

coronavirus murins car il induit une hépatite fulminante responsable de la mort de l'animal entre 3 et 5 jours post-infection (Le Prévost *et al.*, 1975; Stohlman *et al.*, 1998).

En 2003, un nouveau coronavirus humain causant des épidémies majeures fit son apparition, le virus du SARS (syndrome respiratoire aiguë sévère) (Drosten *et al.*, 2003). En fait, le coronavirus du SARS cause une maladie plus sévère chez les humains en infectant les cellules épithéliales alvéolaires de même que celles des voies respiratoires supérieures. Également, des virions ont été retrouvés dans le foie, les reins et même, dans l'intestin grêle des patients infectés (Lau et Peiris, 2005; Perlman et Dandekar, 2005). La période d'incubation du SARS varie entre 2 et 10 jours, mais peut toutefois s'allonger jusqu'à 16 jours, alors que la phase respiratoire de la maladie dure de 2 à 7 jours après la phase prodromique. Ce coronavirus induit généralement des problèmes respiratoires modérés à sévères dans les 8 à 12 jours suivant l'apparition des symptômes. Finalement, la phase de convalescence commence généralement de 14 à 18 jours suivant la période prodromique (Booth *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Peiris *et al.*, 2003). Plusieurs approches thérapeutiques ont été utilisées dans le but de contrer l'infection par le SARS, telles que l'utilisation de la ribavirine, des stéroïdes, des inhibiteurs de protéases et d'IFN- α (Stockman *et al.*, 2006). Une étude préliminaire effectuée avec des patients atteints du SARS a permis de constater que l'utilisation combinée de corticostéroïdes et d'IFN- α diminuait les problèmes respiratoires induits lors de l'infection (Loutfy *et al.*, 2003). L'importance des IFN de type I a également été démontrée par l'utilisation d'un modèle animal. Effectivement, l'injection intranasale du virus MHV1 chez des souris A/J cause une atteinte pulmonaire semblable à celle provoquée par le SARS. Ces souris induisent de haut niveaux de TNF- α et d'IFN- γ , mais une faible réponse en IFN de type I, voire une inhibition de l'IFN- α , contrairement aux souris résistantes C57BL/6 pour lesquelles les niveaux d'IFN de type I sont assez élevés (De Albuquerque *et al.*, 2006; Zorzitto *et al.*, 2006; Baig et Fish, 2008).

L'implication des cytokines et des chimiokines dans l'évolution clinique de la maladie induite par le SARS a été clairement démontrée. L'IFN- α , l'IFN- γ , l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12 et le TGF- β augmentaient deux semaines après le début de l'infection par le

virus du SARS alors que des hauts niveaux d'IL-8, de CCL2 (chemokine (C-C motif ligand 2), de CXCL9 et de CXCL10 étaient associés à la phase aiguë de l'infection (Wong *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005). En fait, la chimiokine CXCL10 était fortement élevée dans les poumons et les tissus lymphoïdes des patients infectés par le SARS et ce, jusqu'à la l'étape de la convalescence (Jiang *et al.*, 2005). Au contraire, le TNF- α , l'IL-2, l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 ne semblaient pas être impliqués dans le développement de la maladie (Huang *et al.*, 2005). L'évasion du virus SARS des défenses immunitaires au cours de l'infection virale serait favorisée par une diminution de la production des interférons de type I (α et β) et type II (γ). Ainsi, la protection antivirale médiée par ces interférons aurait pu induire des réponses immunitaires innées et adaptatives empêchant ainsi l'évasion virale (Castilletti *et al.*, 2005).

2.3.3- Structure des coronavirus

Les coronavirus se présentent sous forme de particules sphériques enveloppées de 100 à 160 nm de diamètre, possédant une capsidie hélicoïdale et un ARNs_b de polarité positive de 27 à 32 kb. Leur couche externe est constituée d'une enveloppe lipidique acquise lors de leur bourgeonnement hors de la cellule préalablement infectée (Lai et Cavanagh, 1997). La structure des particules virales comprend la glycoprotéine de surface (S), la petite protéine d'enveloppe (E), la phosphoprotéine de la nucléocapsidie (N), la glycoprotéine transmembranaire (M) et l'hémagglutinine-estérase (HE) (Figure 3).

La protéine S forme de larges spicules à la surface de la particule virale lui donnant l'aspect caractéristique d'une couronne. La partie S1 de cette protéine se fixe à son récepteur spécifique, la molécule CEACAM1 (Dveksler *et al.*, 1991), et favorise par la suite la fusion cellulaire nécessaire à son entrée dans la cellule-cible via sa deuxième partie S2 (Lai et Cavanagh, 1997). En plus d'être importante dans le tropisme cellulaire, la protéine S serait également responsable de la fusion entre deux cellules possédant ou non le récepteur CEACAM1, provoquant l'apparition de larges syncytia qui caractérisent l'effet cytopathique (CPE) (Lai et Cavanagh, 1997; Gallagher et Buchmeier, 2001;

Nakagaki *et al.*, 2005). Finalement, les anticorps monoclonaux reconnaissant la protéine S peuvent également neutraliser la fixation du virus à ce récepteur et le pouvoir infectieux des coronavirus (Gallagher et Buchmeier, 2001).

La petite protéine E serait impliquée dans l'assemblage des particules virales et le bourgeonnement (Vennema *et al.*, 1996). Cependant, cette protéine ne serait pas essentielle puisque des virions infectieux peuvent tout de même être libérés de la cellule lors de la réplication par un virus n'exprimant pas la protéine E (Kuo et Masters, 2003). La protéine E serait aussi impliquée dans l'induction de l'apoptose des cellules infectées par les coronavirus (An *et al.*, 1999).

La protéine N est une phosphoprotéine qui forme la nucléocapside en se liant avec l'ARN viral. Cette protéine interagit avec les protéines M et S lors de l'incorporation de la nucléocapside dans les nouvelles particules virales (Kuo et Masters, 2002).

La glycoprotéine M a comme particularité d'interagir avec la nucléocapside, mais d'être également exposée à la surface de la particule virale due à son domaine trans-membranaire (Lai et Cavanagh, 1997). Cette protéine a pour rôle de diriger l'assemblage des nouvelles particules virales et de déterminer le site de bourgeonnement dans la cellule (de Haan *et al.*, 1999; Kuo et Masters, 2002; Narayanan *et al.*, 2003).

L'hémagglutinine-estérase (HE) est une protéine qui ne semble pas essentielle à la réplication des coronavirus puisque certains virus ne la possèdent pas (Yokomori *et al.*, 1991). Toutefois, l'expression de cette protéine de façon recombinante dans des cellules animales infectées par la souche MHV-JHM augmente la virulence de l'infection (Lissenberg *et al.*, 2005). Le rôle de la protéine HE dans l'entrée virale ou lors de la libération des virions hors de la cellule n'est pas encore clairement déterminé (Popova et Zhang, 2002).

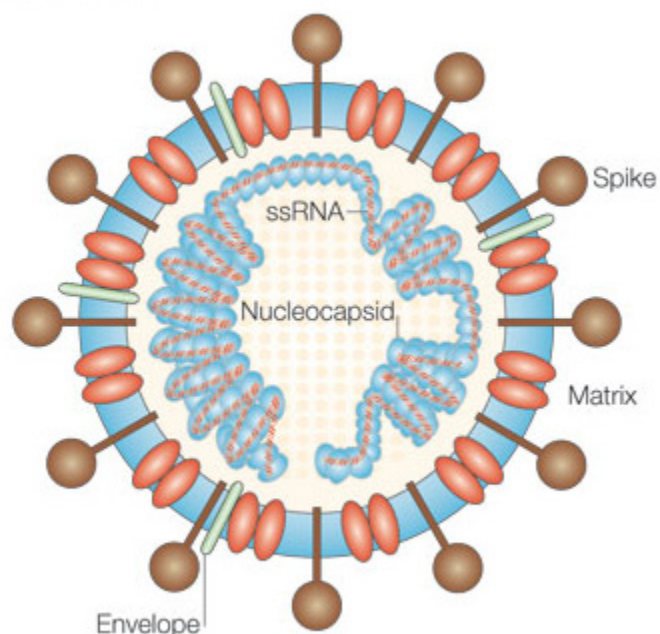


Figure 3. Structure des coronavirus (Dandekar et Perlman, 2005)

L'ARN génomique des coronavirus est de polarité positive, possède une coiffe en 3', une queue polyadénylée (poly-A) de région variable en 5' et peut servir d'ARNm fonctionnel. En fait, l'ARNm des coronavirus peut être naturellement infectieux (Lai et Cavanagh, 1997). Une séquence de 65 à 98 nucléotides, définie comme la séquence « leader », est présente à l'extrémité 5' de l'ARN génomique et de chaque ARN sous-génomique. Une région UTR de 200 à 400 nucléotides suit cette séquence « leader ». Une autre séquence UTR de 200 à 500 nucléotides est également retrouvée à l'extrémité 3' suivie de la queue poly-A. Ces deux séquences UTR en 3' et 5' sont importantes pour la réplication et la transcription de l'ARN viral (Fields *et al.*, 2007). Les séquences restantes de l'ARN génomique contiennent de 7 à 14 ORFs (open reading frame), dépendamment des coronavirus. Le gène 1, qui correspond au deux tiers de l'ARN génomique à partir de l'extrémité 5', est d'une longueur de 20 à 22 kb et contient 2 ORFs superposées, soient les ORF1a et ORF1b. Ces ORFs sont traduites en un polypeptide qui sert de précurseur au complexe protéique impliqué dans la transcription

et la réplication. Plus spécifiquement, l'ORF1b code pour la polymérase (*Pol*) virale ARN-dépendante ainsi que pour une hélicase multifonctionnelle (Fields *et al.*, 2007).

Ainsi, l'ordre des gènes présents chez tous les coronavirus codant pour les ORF1a, ORF1b de même que les 4 protéines structurales sont 5'-*Pol-S-E-M-N*-3'. Ces 4 gènes structuraux sont insérés dans différentes régions ORFs, codant pour d'autres protéines structurales ainsi que le gène codant pour la glycoprotéine HE. Bien qu'elle soit bien conservée à l'intérieur d'un même groupe, la glycoprotéine HE varie énormément en fonction des coronavirus, tant au niveau de la séquence en nucléotides, l'ordre génomique et la méthode d'expression. De plus, la glycoprotéine HE et les protéines structurales codées par les autres ORFs ne sont pas essentielles à la réplication virale, mais leur délétion peut provoquer une atténuation de la pathogénicité (de Haan *et al.*, 2002).

2.3.4- Réplication des coronavirus

2.3.4.1- Étapes de la réplication virale

La première étape de la réplication des coronavirus est celle de l'attachement des particules virales au récepteur CEACAM1 de la cellule-cible via la protéine de surface S. Cet attachement induit un changement de conformation de la protéine S permettant par la suite aux particules virales de pénétrer dans la cellule par la fusion de leur enveloppe avec la membrane cellulaire ou encore, dans une vésicule endosomale (Dveksler *et al.*, 1991; Lai et Cavanagh, 1997; Zelus *et al.*, 2003). Certains coronavirus, dont les MHV, induisent une fusion cellule-cellule dans des conditions de pH optimum neutre ou légèrement alcalin, suggérant que la fusion entre la membrane plasmique et l'enveloppe virale s'effectuerait dans des conditions de pH physiologique (Lai et Cavanagh, 1997). Au contraire, l'infectivité de certaines souches de MHV est réduite, mais pas complètement, lorsqu'elles sont incubées avec des drogues lysomotropiques, suggérant que ces virus peuvent aussi entrer par un processus endosomal (Gallagher *et al.*, 1991). Dans le cas du virus du SARS, une protéolyse médiée par la cathepsine L est requise afin de permettre la fusion membranaire et l'entrée virale (Matsuyama *et al.*,

2005). La fusion entre le virus du SARS et la cellule-cible, comme chez d'autres coronavirus murins, nécessite également la présence de cholestérol, possiblement impliqué dans le réarrangement des protéines membranaires (Thorp et Gallagher, 2004; Choi *et al.*, 2005).

Suite à la pénétration virale, la nucléocapside est relarguée dans le cytoplasme et l'ARN devient accessible pour la transcription. Cependant, le mécanisme exact est encore mal défini (Mohandas et Dales, 1991; Yu et Lai, 2005). Le complexe transcriptase-répliqueuse, inclus dans les ORF1a et 1b, est d'abord synthétisé à partir de l'ARN parental. Par la suite, ce complexe permet la synthèse d'un ARNsb de polarité négative. Ce nouvel ARN sert ensuite à la transcription des 7 ARN sous-génomiques codant pour les différentes protéines de structure et les protéines nécessaires à l'assemblage des nouveaux virions. Ces ARN sous-génomiques de polarité positive ont la particularité de posséder une même extrémité 3', mais différentes extrémités 5' (Brierley *et al.*, 1987; Lai et Cavanagh, 1997). Les protéines virales nouvellement synthétisées (dont la protéine M) sont insérées dans le réticulum endoplasmique et prêtes à l'assemblage (de Haan et Rottier, 2005). Cependant, la nucléocapside (l'ARN et la protéine N) semble se lier à la protéine M et à d'autres protéines virales dans un compartiment de bourgeonnement situé entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Stohlman et Lai, 1979; Tooze *et al.*, 1984; Sims *et al.*, 2000). La protéine E est par la suite ajoutée dans ce compartiment et la particule virale en formation est transportée vers l'appareil de Golgi (Opstelten *et al.*, 1995; Corse et Machamer, 2002). Les protéines S et HE sont transportées vers la particule virale mature via l'appareil de Golgi où elles sont préalablement glycolysées (Holmes *et al.*, 1981; Opstelten *et al.*, 1995).

Finalement, les nouveaux virions sont accumulés dans des vésicules cytoplasmiques aux parois lisses. Ces vésicules vont fusionner avec la membrane cellulaire et les particules virales seront éjectées par un phénomène semblable à l'exocytose. La libération des virions peut toutefois être restreinte à certaines zones cellulaires (Tseng *et al.*, 2005a). Toutes les étapes de la réplication des coronavirus se produisent dans le cytoplasme cellulaire (Figure 4).

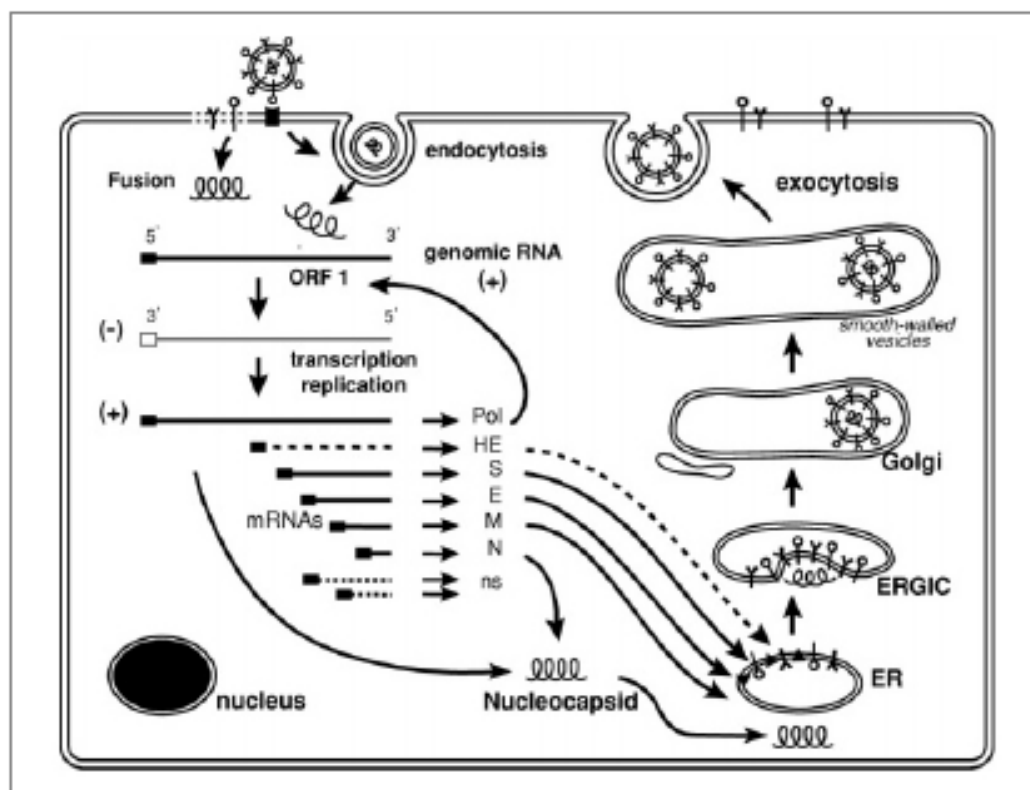


Figure 4. Réplication des coronavirus (Fields *et al.*, 2007)

2.3.4.2- Signalisation intracellulaire impliquée dans la réplication virale

Lors de la réplication des coronavirus dans une cellule, certaines voies intracellulaires, notamment les MAPK, sont activées. Toutefois, certaines de ces voies seraient essentielles à la réplication de cette famille de virus. Des résultats récents sur la réplication du virus du SARS pointent plusieurs voies de signalisation cellulaire. Lors de l'infection de cellules Vero E6 par le virus du SARS, une activation des voies intracellulaires p38 MAPK, ERK -1/2 MAPK, JNK (jun N-terminal kinase), PI3K (phosphoinositide-3 kinase)/Akt et eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) a été observée suite à la phosphorylation de ces molécules (Mizutani *et al.*, 2004a; Mizutani *et al.*, 2004b; Mizutani *et al.*, 2004c; Mizutani *et al.*, 2005). Bien que ces activations aient été induites lors de l'infection par le virus du SARS, l'inhibition de la p38 MAPK par un inhibiteur spécifique (SB203580) n'a pas diminué la synthèse des protéines virales (Mizutani *et al.*, 2004c). Par contre, cette inhibition a réduit les effets

cytopathiques induits sur des cellules Vero E6 (Mizutani *et al.*, 2004b). Par ailleurs, la molécule anti-apoptotique Akt n'a pas pu prévenir l'apoptose induite par le virus du SARS bien qu'elle soit activée lors de l'infection virale (Mizutani *et al.*, 2004b). Cependant, l'inhibition des voies JNK et PI3K/Akt a empêché la persistance virale dans les cellules Vero E6, au contraire des voies dépendantes des p38 MAPK et MAPK/ERK kinase (Mizutani *et al.*, 2005). Il a également été observé que la molécule STAT3, qui est constitutivement phosphorylée et impliquée dans la voie d'activation de l'IL-6, était déphosphorylée lors d'une infection par le virus du SARS. L'inhibition de la p38 MAPK, mais non pas de la ERK-1/2 MAPK et JNK, pouvait toutefois partiellement inhiber cette déphosphorylation (Mizutani *et al.*, 2004a).

Pour ce qui est des coronavirus murins, les virus MHV, peu d'études ont été réalisées concernant les molécules et voies de signalisation impliquées lors de la réplication virale. Une activation optimale de la p38 MAPK a été observée durant les 5 premières minutes suivant l'infection par le virus MHV3 des macrophages péritonéaux de souris Swiss. La voie ERK-1/2 MAPK fut également activée entre 20 à 30 minutes post-infection. L'inhibition de la voie p38, mais non pas celle de la ERK-1/2 MAPK, a aboli l'induction de la prothrombinase fgl-2, une protéine sécrétée par les macrophages infectés par le virus MHV3 et qui est impliquée dans la coagulation intravasculaire au niveau des cellules endothéliales lors de l'hépatite aiguë (Parr *et al.*, 1995; McGilvray *et al.*, 1998). Par contre, chez les cellules de la lignée macrophagique J774.1 infectées avec le virus neurotrophique MHV-A59, les molécules p38 MAPK et JNK, mais non pas ERK-1/2 MAPK, étaient activées. Par ailleurs, le virus MHV-A59, préalablement traité avec les rayons UV, n'a pas permis l'activation de ces voies de signalisation, démontrant ainsi l'importance de la réplication dans cette induction (Banerjee *et al.*, 2002). La phosphorylation de eIF4E et la production d'IL-6 seraient aussi dépendantes de l'activation de la p38 MAPK. Ainsi, l'inhibition de la voie p38 MAPK empêcherait une synthèse adéquate des ARN viraux puisque le facteur eIF4E est impliqué dans la traduction des ARNm (Waskiewicz *et al.*, 1999; Banerjee *et al.*, 2002).

2.4- Le virus de l'hépatite murine de type 3

2.4.1- Introduction

Le virus de l'hépatite murine de type 3 (MHV3) est considéré comme un excellent modèle animal afin de mieux comprendre les différents désordres immunopathologiques induits lors d'une hépatite virale (Lamontagne et Dupuy, 1984; Jolicoeur et Lamontagne, 1989). Parmi toutes les souches de MHV, le sérotype MHV3 est considéré comme le plus virulent. Les conséquences de l'infection par le virus MHV3 dépendent en fait de la génétique de l'hôte, de son âge et de l'efficacité du système immunitaire à répondre à l'infection (Lévy-Leblond *et al.*, 1979). Les souris susceptibles C57BL/6 infectées par le virus pathogène L2-MHV3 vont développer une hépatite aiguë et une immunodéficience en cellules B et T dans tous les organes lymphoïdes. Au contraire, l'infection des souris semi-résistantes C3H ou SJL provoque l'apparition d'une hépatite chronique avec une persistance virale dans le cerveau. Chez ces souris, la persistance virale entraîne une paralysie après 3 à 6 mois suivant le début de l'infection (Le Prévost *et al.*, 1975). Au contraire, les souris A/J sont résistantes à l'hépatite induite par le virus MHV3 (Lamontagne *et al.*, 1989a). La résistance à l'infection aiguë et chronique serait modulée par les gènes de la région H-2 de même que la présence et le type d'isoforme du récepteur spécifique reconnu (CEACAM1) au virus MHV3 présent à la surface des cellules-cibles (Lévy-Leblond *et al.*, 1979; Nedellec *et al.*, 1994). D'autres études ont démontré une induction d'IL-1, de TNF- α et d'IFN- γ par des macrophages myéloïdes de souris A/J (Lucchiari *et al.*, 1993). La sécrétion d'IFN- γ par ces cellules serait un élément important dans la résistance des souris A/J contre l'infection par le virus MHV3 (Lucchiari *et al.*, 1992).

2.4.2- L'hépatite aiguë

Les souris susceptibles C57BL/6 infectées par le virus pathogène L2-MHV3 développent une hépatite aiguë mortelle dans les 3 à 5 jours post-infection (Le Prévost *et al.*, 1975). Bien que le virus MHV3 soit lymphotrope (Lamontagne et Dupuy, 1984),

neurotrophe (Tardieu *et al.*, 1986) et hépatotrophe (Taguchi *et al.*, 1986), le foie demeure l'organe principal pour la réplication du virus MHV3 (Le Prévost *et al.*, 1975). Au niveau hépatique, les ARN viraux ont été détectés après 24 heures d'infection alors que les lésions hépatiques ont été observées dès 48 heures post-infection. 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). Il a toutefois été démontré que l'atrophie thymique observée lors de l'infection par le virus MHV3 était en fait due à une perte de cellules dendritiques thymiques provoquant ainsi un retard de maturation et indirectement, l'apoptose subséquente des thymocytes. En effet, les thymocytes ne possèdent pas le récepteur au virus MHV3 et ne peuvent pas être infectées (Godfraind *et al.*, 1995a; Godfraind et Coutelier, 1998).

La sensibilité de l'infection par le virus MHV3, en fonction de la génétique de la souris, ne dépend pas du niveau de réplication virale. Effectivement, il a été démontré qu'il n'y avait aucune différence quant à la quantité de virus pathogène L2-MHV3 et non pathogène YAC-MHV3 retrouvée dans le cerveau, la rate, le foie et les ganglions lymphatiques des souris susceptibles C57BL/6 et résistantes A/J durant les trois premiers jours d'infection. Par contre, aucune particule virale ne fut détectée dans les thymus de souris infectées par la souche non pathogène YAC-MHV3 chez les deux lignées de souris (Lamontagne et Dupuy, 1985). Des études *in vitro* ont démontré que la permissivité des macrophages péritonéaux, des thymocytes et des cellules non-adhérentes spléniques aux souches virales L2-MHV3 et YAC-MHV3 était différente. Il a donc été suggéré que la résistance de permissivité virale *in vitro* n'était pas liée aux gènes du complexe H-2 et que la pathogénicité induite par le virus MHV3 *in vivo* était reliée à la permissivité des macrophages et des cellules lymphoïdes (Lamontagne et Dupuy, 1985). Effectivement, des différences fines ont été remarquées après 48 heures post-infection *in vitro* au niveau des effets cytopathiques, de la viabilité cellulaire et des titres viraux pour les macrophages péritonéaux, les thymocytes et les cellules non-adhérentes spléniques. Aussi, la restriction partielle de la réplication virale chez ces

cellules provenant des souris résistantes A/J proviendrait d'un contrôle cellulaire intrinsèque agissant probablement au niveau de la production de particules virales infectieuses (Lamontagne *et al.*, 1989a). Une inhibition de l'ARN polymérase pourrait également bloquer une étape cruciale entre la fixation virale et la transcription des ARN viraux (Lamontagne *et al.*, 1989b).

Des études histopathologiques ont révélé que différents organes lymphoïdes, dont le thymus et la rate, devenaient atrophiés chez les souris infectées par le virus pathogène L2-MHV3, mais non pas par le virus non pathogène YAC-MHV3. De plus, aucune lésion histopathologique n'a été observée chez les souris résistantes A/J infectées par l'une ou l'autre des deux souches virales (Lamontagne *et al.*, 1989b). Par ailleurs, une infection et une lyse subséquente des cellules B 14.8⁺μ⁺ et des cellules Thy1.2⁺ ont été notées entre 48 et 72 heures post-infection chez les souris susceptibles C57BL/6, mais pas ou très peu chez les souris résistantes A/J, infectées avec le virus pathogène L2-MHV3 (Jolicoeur et Lamontagne, 1989; Lamontagne *et al.*, 1989b). Il a été proposé que l'intégrité de la moelle osseuse serait primordiale dans la protection et l'établissement de la phase aiguë induite par le MHV3 puisque chez les souris A/J, les désordres cellulaires et immunitaires dans différents organes lymphoïdes sont absents (Lamontagne *et al.*, 1989b; Jolicoeur et Lamontagne, 1994). Ces résultats ont donc permis de démontrer que le virus MHV3 possède la capacité d'induire une immunodéficiences cellulaire et une hépatite soit aiguë ou chronique en fonction de facteurs relevant de la lignée murine ou de la souche de virus. De plus, l'immunodéficiences induite durant l'infection virale diminue les capacités de l'hôte à contrôler la propagation virale et à favoriser son élimination.

Il a été observé que les cellules T CD4⁺ augmentaient fortement dans le foie des souris infectées par le virus pathogène L2-MHV3 alors que les populations thymiques et intrahépatiques CD4⁺CD8⁺ et CD4⁺CD8⁻ diminuaient au cours de l'infection virale (Lamontagne *et al.*, 1997). De plus, un changement dans l'activation des cellules T a été noté dans le foie, mais non pas dans la rate, soit le passage d'un phénotype αβTCR^{inter} vers un phénotype αβTCR^{high}. En fait, les lymphocytes αβTCR^{inter} et αβTCR^{high}

exprimant fortement la molécule LFA-1 étaient augmentés dans le foie des souris infectées par le virus L2-MHV3 (Lamontagne *et al.*, 1997). Alors qu'une augmentation de la population intrahépatique T CD4⁺ était notée chez les souris infectées par le virus L2-MHV3, cette population diminuait dans le foie des souris infectées par le virus non pathogène YAC-MHV3. Cependant, cette augmentation de cellules T CD4⁺ était accompagnée d'une diminution de cellules T CD8⁺ intrahépatiques (Lamontagne *et al.*, 2001). Par ailleurs, la population intrahépatique T CD8⁺ diminuait durant les 24 premières heures d'infection par le virus YAC-MHV3, mais augmentait graduellement jusqu'à 15 jours post-infection. Seules les cellules T CD8⁺ intrahépatiques provenant des souris infectées par le virus YAC-MHV3 répondaient *ex vivo* à la stimulation par la ConA ou la phytohémagglutinine (PHA) (Lamontagne *et al.*, 2001). Il a également été observé que la population intrahépatique NK1.1⁺αβTCR^{inter} (NK-T) diminuait chez les souris infectées par les virus L2-MHV3 ou YAC-MHV3 (Lamontagne *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent donc que le phénotype atténuant du virus YAC-MHV3 serait relié à deux observations, soient l'absence d'augmentation en cellules CD4⁺αβTCR^{inter} et NK1.1⁺αβTCR^{inter} ainsi que le recrutement et l'activation des cellules T CD8⁺ dans le foie (Lamontagne *et al.*, 2001).

Lors d'une infection par les virus MHV, l'induction de l'apoptose est provoquée par la protéine virale E. Cependant, elle peut être empêchée par l'augmentation de l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 chez les cellules infectées (An *et al.*, 1999). Au niveau des cellules NK, il est connu que l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15, mais pas l'IL-12, peuvent protéger ces cellules contre l'apoptose en augmentant l'expression de Bcl-2 (Armant *et al.*, 1995; Carson *et al.*, 1997; Cooper *et al.*, 2002).

2.4.3- L'hépatite chronique

Les souris semi-résistantes (C3H et SJL) à l'infection par le MHV3 présentent la même symptomatologie que celle de la phase aiguë avec des lésions hépatiques moins sévères, mais les souris survivant plus de 15 jours après l'infection développent une maladie chronique. Il est possible de détecter un titre viral dans le foie, mais les

particules virales sont généralement éliminées après 7 jours post-infection au niveau des fèces et des liquides biologiques (Lamontagne *et al.*, 1989a). Cependant, des antigènes viraux peuvent être retrouvés dans le foie des souris C3H ou SJL chroniquement infectées et ce, jusqu'à 4 mois après le début de l'infection par le virus MHV3 (Le Prévost *et al.*, 1975).

La résistance des souris SJL face au virus MHV3 serait attribuée au fait que ces souris expriment un allèle différent du récepteur viral, la molécule CEACAM1b (Barthold et Smith, 1987), alors que celui des souris susceptibles C57BL/6 est la molécule CEACAM1a (Dveksler *et al.*, 1991). De plus, la capacité du récepteur CEACAM1b à lier le virus MHV3 serait de 10 à 30 fois moindre que celle du récepteur CEACAM1a (Ohtsuka et Taguchi, 1997). Le développement de la maladie chronique chez ces souris semi-susceptibles serait associé à l'établissement d'une immunodéficience partielle en cellules B et T. En effet, les réponses cellulaires et humorales chez les souris chroniquement infectées sont diminuées, notamment au niveau de la sécrétion d'IgG (Leray *et al.*, 1982; Jolicoeur et Lamontagne, 1994). Plus précisément, les cellules B et T spléniques sont diminuées dès 48 heures post-infection et demeurent à des niveaux faibles jusqu'à 3 mois et/ou à la mort de l'animal. Ces diminutions cellulaires sont associées à l'apoptose des cellules T thymiques, via l'infection des cellules stromales, et des cellules pré-B et B myéloïdes (Jolicoeur et Lamontagne, 1994).

2.4.4- Les variants de pathogénicité du virus MHV3

2.4.4.1- Production des variants de pathogénicité du virus MHV3

Différents variants de pathogénicité (atténués) du virus MHV3 ont été produits. Ces variants constituent des outils très importants pour l'étude des processus immunopathologiques. Ainsi, le variant faiblement atténué 51.6-MHV3 provient d'une infection de cellules L2 par le virus pathogène L2-MHV3 en présence de l'anticorps monoclonal neutralisant A51 (Lamontagne *et al.*, 1994). Ce variant d'échappement est moins virulent que le virus L2-MHV3, car il provoque la mort des souris susceptibles

C57BL/6 entre 5 et 9 jours. Il provoque une hépatite aiguë en présence de foyers hépatiques extensifs nécrotiques (Martin *et al.*, 1994; Lamontagne *et al.*, 1994). Tout comme le virus pathogène L2-MHV3, ce variant cause une immunodéficience en lymphocytes B et T. Le variant peu atténué 51.6-MHV3 induit une immunodéficience en cellules B et T suite à une infection par voie intrapéritonéale. Par contre, les lymphocytes B sont diminués suite à une inoculation par voie intranasale, alors qu'aucune diminution en lymphocytes T n'est observée (Lamontagne *et al.*, 1994).

Le variant fortement atténué CL12-MHV3 provient d'une infection de cellules L2 par le virus pathogène L2-MHV3 en présence de l'anticorps monoclonal neutralisant A37 (Lamontagne *et al.*, 1994). Ce second variant d'échappement est fortement atténué car il provoque la mort des souris C57BL/6 plutôt entre 8 et 10 jours. Il provoque toutefois une faible hépatite avec la présence de foyers inflammatoires périvasculaires (Martin *et al.*, 1994; Lamontagne *et al.*, 1994). Par ailleurs, il a été démontré que le variant CL12-MHV3 n'était pas en mesure d'induire une immunodéficience en cellules B et T suivant une inoculation intrapéritonéale ou intranasale.

Lamontagne et Dupuy (1984) ont généré un variant non pathogène, le YAC-MHV3, suite à une infection persistante du virus pathogène L2-MHV3 sur la lignée cellulaire lymphoïde YAC-1. Bien que le variant non pathogène YAC-MHV3 ait la capacité de se répliquer au niveau du foie, ce dernier ne peut induire qu'une hépatite subclinique chez les souris susceptibles C57BL/6 (Lamontagne et Dupuy, 1984). La réplication virale est de courte durée au niveau du foie et les réponses humorales et cellulaires sont sollicitées afin de permettre l'élimination virale en moins de 14 jours post-infection (Lamontagne et Dupuy, 1984; Lamontagne *et al.*, 2001). Par ailleurs, aucune immunodéficience en lymphocytes B et T n'est observée lors d'une infection par ce variant non pathogène, puisque ce dernier n'est pas en mesure d'infecter ni les lymphocytes B, ni les DC thymiques (Lamontagne *et al.*, 1989b).

Le degré de pathogénicité de chacun des variants de pathogénicité se traduit aussi par l'évolution différente dans la production de particules virales infectieuses selon le moment post-infection. Effectivement, la réplication virale dans le foie atteint un

maximum vers 2 jours post-infection pour le virus pathogène L2-MHV3, mais vers 8 jours pour le variant 51.6-MHV3. Au contraire, les particules virales infectieuses ne sont pas détectées avant 4 jours dans le foie des souris infectées par le variant fortement atténué CL12-MHV3 (Martin *et al.*, 1994).

2.4.4.2- Le tropisme cellulaire des variants de pathogénicité du virus MHV3

Au contraire du virus parental pathogène, le variant d'échappement 51.6-MHV3 n'est plus en mesure d'infecter les LSEC, mais a toutefois gardé la capacité de se répliquer dans les KC, les cellules de Ito et les hépatocytes de souris C57BL/6 (Martin *et al.*, 1994).

Le second variant d'échappement, le CL12-MHV3, a perdu sa capacité d'infecter les LSEC de même que les KC, mais peut encore se répliquer dans les cellules de Ito et les hépatocytes (Martin *et al.*, 1994).

Le variant non pathogène YAC-MHV3 n'est pas en mesure d'infecter les LSEC et une diminution de la réplication a été observée chez des cellules de Kupffer (Lamontagne et Dupuy, 1987; Lamontagne *et al.*, 1989b).

Ces différents variants de pathogénicité possédant des tropismes cellulaires particuliers pourraient être utiles afin de discriminer les rôles des cellules du foie impliquées dans la tolérance hépatique, telles que les LSEC et les KC, dans l'établissement de l'hépatite aiguë induite par le virus MHV3.

2.5- Le récepteur spécifique reconnu des MHV : la molécule CEACAM1

2.5.1- Structure et expression des molécules CEACAM

La molécule CEACAM est un membre de la famille des antigènes carcinoembryonnaires et est engagée dans une variété de processus de croissance et de différenciation cellulaires de même que dans certaines pathologies (Nagaishi *et al.*,

2006). Chez l'humain, la famille des protéines CEACAM compte 18 gènes et 11 pseudogènes localisés sur le chromosome 19q13.2. Onze différents isoformes de la molécule CEACAM ont été identifiés chez l'humain alors que 4 de ces isoformes ont été retrouvés chez la souris. Les ligands des molécules CEACAM sont essentiellement de type bactérien ou viral. Effectivement, on a répertorié entre autre la protéine Opa de *Neisseria*, la protéine OmpP5 de *Haemophilus influenzae*, les flagelles d'*E. coli* et de *Salmonella*, de même que la protéine de surface des virus MHV (Gray-Owen et Blumberg, 2006). Cependant, plusieurs phénomènes cellulaires sont associés à des interactions entre deux molécules CEACAM identiques (homophiliques) ou différentes (hétérophiliques). La molécule CEACAM1 est la plus conservée des molécules de la famille CEACAM. Elle est constituée en position N-terminale d'une boucle Ig variable (IgV) suivie d'une ou plusieurs boucles Ig de type C2 (IgC₂) (Tan *et al.*, 2002). La région N-terminale est particulièrement impliquée dans les interactions cellulaires homophiliques de même que dans la reconnaissance et l'infection de certaines bactéries et virus (Watt *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2002). Par ailleurs, les différentes boucles IgV et IgC₂ peuvent être glycolysées à des degrés divers (Lucka *et al.*, 2005) et sont maintenues par une ancre membranaire à caractère hydrophobique constituée de glycosylphosphatidylinositol (Kuespert *et al.*, 2006). Un domaine cytoplasmique long (71-73 aa; CEACAM-L) ou court (10-12 aa; CEACAM-S) complète la structure de la molécule (Figure 5). Ces deux domaines sont exprimés à des niveaux différents dans les cellules et possèdent des fonctions complètement opposées. En effet, la séquence cytoplasmique longue possède deux régions ITIMs exerçant des actions inhibitrices, alors que la séquence cytoplasmique courte est considérée comme activatrice due au manque de ces ITIMs (Gray-Owen et Blumberg, 2006). Cependant, le domaine court possède des sites de liaison pour la calmoduline (Edlund *et al.*, 1996), la tropomyosine et l'actine globulaire, suggérant une interaction de régulation avec le cytosquelette (Schumann *et al.*, 2001). Il est à noter que l'activation des régions ITIMs permet le recrutement et l'activation subséquente des molécules SHP (src homology phosphatase)-1 et SHP-2, qui sont des tyrosine phosphatases (Chen *et al.*, 2001).

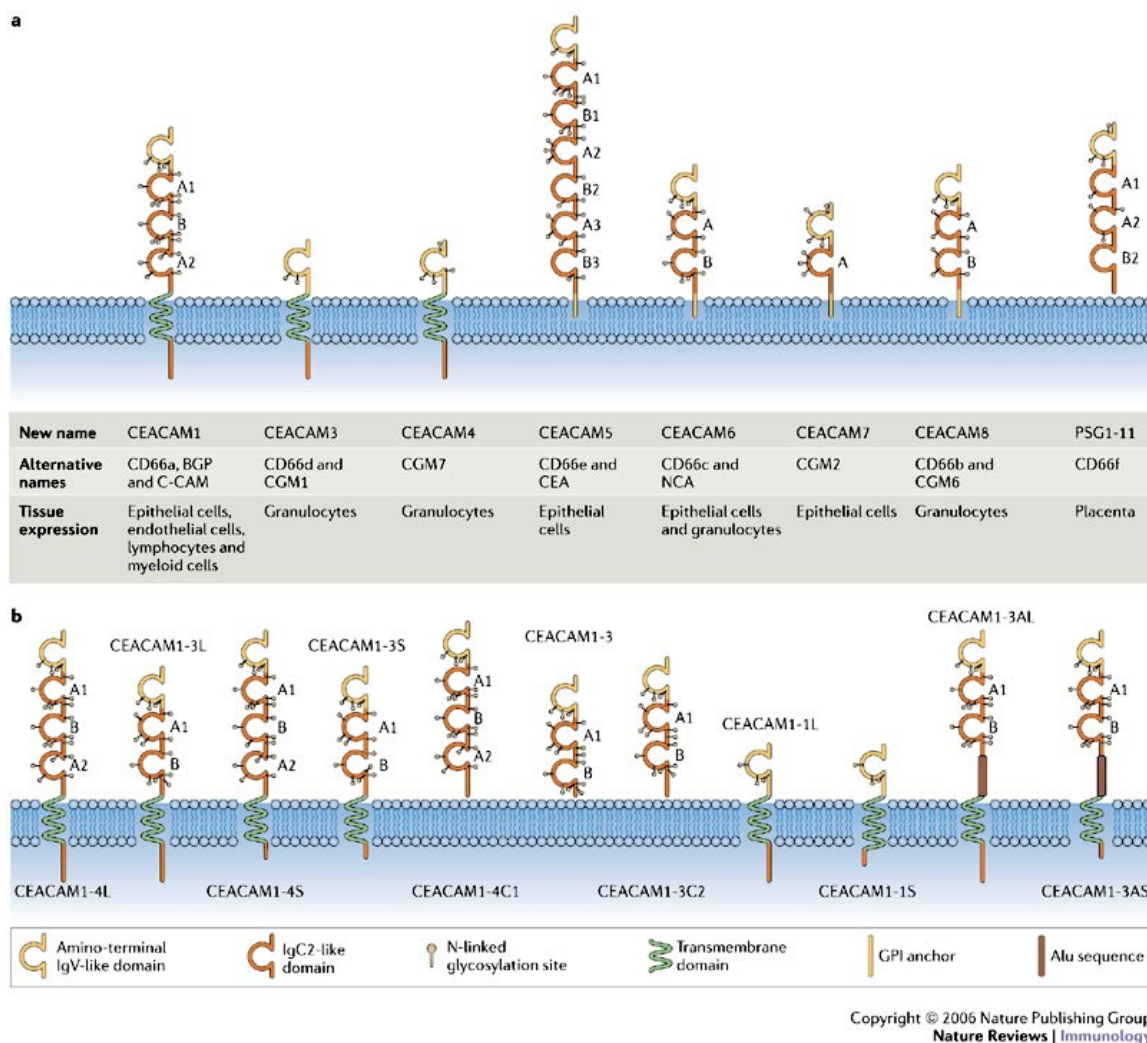


Figure 5. Structure et expression des différentes molécules CEACAM (Gray-Owen et Blumberg, 2006).

La molécule CEACAM1 est exprimée à la surface des cellules épithéliales, des cellules endothéliales, des hépatocytes (Godfraind et Coutelier, 1998), des macrophages (Coutelier *et al.*, 1994), des neutrophiles (Kuroki *et al.*, 1992; Stocks et Kerr, 1993), des cellules dendritiques (Kammerer *et al.*, 2001) et des lymphocytes B (Coutelier *et al.*, 1994; Greicius *et al.*, 2003). Ce récepteur n'est toutefois que très faiblement exprimé, voire absent, à la surface des cellules NK, des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, des

lymphocytes exprimant un TCR- $\gamma\delta$ et des lymphocytes intestinaux intraépithéliaux (Moller *et al.*, 1996; Kammerer *et al.*, 1998). Cependant, son expression augmente lorsque les cellules T CD4⁺ sont stimulées par le complexe TCR-CD3 ou par des cytokines, telles que les IL-2, IL-7 ou IL-15 (Moller *et al.*, 1996; Kammerer *et al.*, 1998; Donda *et al.*, 2000; Boulton et Gray-Owen, 2002).

2.5.2- Rôles associés au récepteur CEACAM1

Les molécules CEACAM agissent généralement via leur adhésion cellulaire par des interactions homophiliques ou hétérophiliques (Benchimol *et al.*, 1989). Plusieurs études ont été effectuées afin de déterminer les rôles reliés aux molécules CEACAM. Elles sont impliquées notamment dans la néogenèse vasculaire (Wagener et Ergun, 2000), le développement des tumeurs (Fournes *et al.*, 2001), l'architecture tissulaire (Ilantzis *et al.*, 2002; Kirshner *et al.*, 2003), le métabolisme de l'insuline (Najjar, 2002) de même que l'apoptose et l'inhibition des cellules tumorales (Fournes *et al.*, 2001; Kirshner *et al.*, 2003; Nittka *et al.*, 2004).

Ces fonctions ont été particulièrement étudiées à l'aide de souris knock-out pour le gène *Ceacam1* (*Ceacam1*^{-/-}). Des études ont rapporté que les souris *Ceacam1*^{-/-} possédaient une néovascularisation et un remodelage vasculaire réduits à l'âge adulte (Horst *et al.*, 2006). Par contre, le VEGF (vascular endothelial growth factor) augmentait l'expression de CEACAM1 et vice-versa, favorisant ainsi la formation de microvaisseaux et l'activation de molécules pro-angiogéniques (Ergun *et al.*, 2000). Il a également été démontré que les souris *Ceacam1*^{-/-} étaient hyper-insulinémiques et résistantes à l'insuline, en conséquence d'un problème d'élimination de l'insuline dans le foie. Cette anomalie serait causée par l'absence d'endocytose du complexe insuline-récepteur à l'insuline, effectuée par la molécule CEACAM1, réduisant ainsi la dégradation normale de l'insuline dans les lysosomes (Soni *et al.*, 1999; Najjar, 2002). Finalement, bien que la molécule CEACAM1 soit souvent associée à différentes tumeurs, dont le cancer du colon (Leung *et al.*, 2006), des actions anti-tumorales lui ont également été attribuées. En effet, l'isoforme CEACAM1-4S est en mesure d'induire

l'apoptose via l'activation de la molécule Bax tout en favorisant le retour des cellules mammaires cancéreuses vers un état phénotypique normal (Kirshner *et al.*, 2003).

2.5.3- Rôles du récepteur CEACAM1 sur les cellules immunitaires

Les effets de l'expression des molécules CEACAM sur les fonctions de différents types cellulaires sont de plus en plus étudiés. Ainsi, l'inhibition de l'activité cytotoxique des cellules NK, indépendante du CMH-I, résulte d'une liaison homophile de la molécule CEACAM1 à la surface de ces cellules (Markel *et al.*, 2002a). Il est toutefois essentiel que la molécule CEACAM1 exprime la forme longue de la queue intracytoplasmique afin d'exercer son action inhibitrice (Watt *et al.*, 2001). Cet effet est relié à l'absence de la molécule TAP2 et au fait que la molécule CMH-I n'est plus en mesure d'être exprimée à la surface des cellules, les rendant donc susceptibles à une action cytotoxique de la part des cellules NK (Moretta et Moretta, 2004). Cependant, une augmentation de l'expression de CEACAM1 a été observée chez des patients déficients pour la molécule TAP2, ce qui expliquerait l'inhibition de l'activité cytotoxique des cellules NK. Effectivement, une interaction homophile entre molécules CEACAM1 permet de supprimer les fonctions cytotoxiques de ces cellules (Markel *et al.*, 2004a; Markel *et al.*, 2004b).

Très peu d'études ont été effectuées afin de déterminer l'action de la molécule CEACAM1 sur les cellules NK-T. Il a été démontré que l'incubation de cellules NK-T avec l'anticorps Kat4c, provoquant un « cross-linking » avec les molécules CEACAM1, diminuait de façon importante la sécrétion d'IFN- γ par ces cellules (Markel *et al.*, 2002b).

Une étude effectuée avec les cellules de la lignée Jurkat (cellules T) transfectées avec les isoformes CEACAM1-3L (3L) ou CEACAM1-3S (3S) a montré que l'isoforme 3L, mais pas l'isoforme 3S, inhibait la sécrétion des cytokines autant de type Th1 (IFN- γ) que de type Th2 (IL-4) (Nagaishi *et al.*, 2006). Cette inhibition pouvait toutefois être compensée par la perte des motifs ITIMs, l'inhibition de SHP-1 ou la transfection des

cellules Jurkat par l'isoforme 3S. Ainsi, la molécule CEACAM1-3L serait en mesure d'inhiber l'activation des cellules T induites par le CD3 et le CD28, qui dans des conditions normales, provoquerait subséquemment l'activation des voies ERK MAPK, JNK, mais non pas la voie p38 MAPK, et la production des cytokines de type Th1 et Th2 (Kaminska, 2005). Une autre étude a été réalisée avec des cellules T spléniques durant leur différenciation en cellules effectrices Th1 ou Th2 en présence de la glycoprotéine de surface du virus MHV comme ligand spécifique de la molécule CEACAM1. Dans ce modèle, il a été plutôt montré que la liaison de la molécule CEACAM1, normalement exprimée lors de la différenciation cellulaire des cellules T spléniques, provoquait une inhibition de la sécrétion des cytokines de type Th1 (IFN- γ), mais pas celles des Th2 (IL-4). Ces résultats suggèrent donc que la différenciation des lymphocytes en Th1 est plus sensible à l'inhibition par le CEACAM1 que la différenciation en Th2 (Iijma *et al.*, 2004).

Les cellules B murines expriment de façon équivalente les isoformes CEACAM1-2 et CEACAM1-4, ce qui correspond à un rapport semblable des domaines intracytoplasmiques long et court (Coutelier *et al.*, 1994; Greicius *et al.*, 2003). L'action inhibitrice ou activatrice du CEACAM1 sur les cellules B dépendrait plutôt de l'état fonctionnel de la cellule et de l'expression des molécules CEACAM1 à la surface. Il a été rapporté que l'expression de CEACAM1 n'était pas affectée par le récepteur à l'IL-4 de même que par l'activation du TLR4 par des agonistes spécifiques (Greicius *et al.*, 2003).

Au niveau des neutrophiles, l'expression de la molécule CEACAM1 est rapidement augmentée en réponse à différents signaux activateurs (Kuroki *et al.*, 1992; Stocks et Kerr, 1993). Bien que les interactions CEACAM-CEACAM ne soient pas suffisantes pour permettre une adhérence adéquate des neutrophiles à la surface des cellules endothéliales, la voie de signalisation dépendante du CEACAM affecterait les fonctions des intégrines (Muenzner *et al.*, 2005). Il est toutefois intéressant de constater que l'activation de la molécule CEACAM1 permettrait aux neutrophiles de résister davantage à l'apoptose, préservant une défense adéquate aux sites d'infection (Singer *et al.*, 2005).

Une seule étude a rapporté que l'incubation de cellules dendritiques murines avec l'anticorps monoclonal AgB10, spécifique pour la molécule CEACAM1, modifiait le phénotype cellulaire et l'expression des marqueurs de surface de ces cellules. De plus, l'AgB10 permettait la libération des chimiokines MIP-1 α et MIP-2 et contribuait à la différenciation des cellules T en Th1 par leur sécrétion d'IL-6 et d'IL-12 (Kammerer *et al.*, 2001).

2.5.4- Signalisation intracellulaire induite par le CEACAM1

Les fonctions inhibitrices de la molécule CEACAM dépendent de l'activation de la séquence intracytoplasmique longue qui est en association avec des domaines ITIMs auxquels les tyrosine phosphatases SHP-1 et SHP-2 peuvent s'y fixer et exercer leurs fonctions inhibitrices (Huber *et al.*, 1999; Izzi *et al.*, 1999). Cette action inhibitrice serait en fait modulée par la région C-terminale de la molécule CEACAM1a, plus précisément au niveau de la Tyrosine 488 (Tyr488) (Huber *et al.*, 1999; Izzi *et al.*, 1999). En effet, des mutations au niveau de la Tyr488 ou des régions de la partie C-terminale empêcheraient l'inhibition de la croissance des cellules tumorales naturellement provoquée par l'action du CEACAM1. Au contraire, la délétion du domaine N-terminal de la molécule CEACAM1 n'aurait aucun effet sur la croissance des cellules tumorales (Izzi *et al.*, 1999).

Il a également été constaté que la molécule CEACAM1 pouvait être impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. Une étude a démontré que la densité des molécules CEACAM1 à la surface cellulaire co-régulait différemment la synthèse d'ADN chez la lignée épithéliale NBT-II via l'activation de la voie ERK-1/2 MAPK et de la p27^{kip1}, l'inhibiteur de kinase cycline-dépendante (Scheffrahn *et al.*, 2005). En effet, lorsque les cellules épithéliales soumises continuellement à une forte concentration de sérum de veau fœtal (FCS) étaient incubées avec un anticorps anti-CEACAM1, la voie ERK-1/2 MAPK était activée et la synthèse d'ADN était augmentée alors que l'expression de la p27 était diminuée. Au contraire, lorsque des cellules cultivées dans un milieu pauvre en FCS étaient incubées en présence de l'anticorps anti-CEACAM1, les réponses des voies

de signalisation intracellulaires mentionnées précédemment étaient inversées (Scheffrahn *et al.*, 2005). Ainsi, ces observations supportent l'hypothèse que la molécule CEACAM1 provoque l'inhibition de la prolifération cellulaire chez des cellules cultivées en présence de facteurs de croissance alors qu'elle coactive la prolifération chez les cellules cultivées en milieu appauvri.

Au niveau de l'apoptose cellulaire, certaines études ont montré que la liaison d'un anticorps spécifique à la molécule CEACAM1-L, via le fragment Fab ou le fragment Fc soluble, provoquait la survie des granulocytes de rat. Cet effet anti-apoptotique est dû à l'activation des molécules SHP-1 et ERK-1/2 MAPK en plus d'une diminution de la caspase-3 (Singer *et al.*, 2005). Dans un même ordre d'idée, il a été démontré que la survie des monocytes humains pouvait être améliorée par une interaction homophile CEACAM1-CEACAM1 provoquant une augmentation de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 et une élimination de la caspase-3. Cette protection serait dépendante de l'activation de la voie PI3K/Akt, mais non pas de celle de la voie ERK-1/2 MAPK (Yu *et al.*, 2006). La différence dans l'activation de la voie ERK-1/2 MAPK chez des granulocytes de rat versus des monocytes humains s'explique par le fait que les cellules humaines n'expriment que l'isoforme CEACAM1-L alors que les granulocytes de rat expriment les isoformes CEACAM1-L et CEACAM1-S dans un rapport de 2.2 à 2.9:1 (Singer *et al.*, 2002).

Par ailleurs, l'expression de CEACAM1 est différente selon l'activation du lymphocyte B. Lorsqu'un anticorps anti-CEACAM1 est ajouté en présence d'un anti-IgM, le lymphocyte B entre en prolifération cellulaire et devient sécréteur d'Ig, mais sans toutefois permettre la commutation isotypique. Cette activation serait dépendante de l'activation de la voie JNK, mais en relation avec les molécules p38 ou ERK-1/2 MAPK (Greicius *et al.*, 2003).

2.5.5- Régulation du récepteur CEACAM1

Bien que la molécule CEACAM1 soit impliquée dans plusieurs pathologies, telles que le cancer du poumon ou le cancer du côlon (Sienel *et al.*, 2003; Leung *et al.*,

2006), celle-ci peut être régulée différemment en fonction des stimuli présents. Or, peu d'études existent sur la régulation des différentes molécules de la famille CEACAM. Lors d'une infection par *Neisseria gonorrhoeae*, il a été démontré que l'expression de la molécule CEACAM1 était augmentée suite à une activation préalable du facteur NF- κ B (Muenzner *et al.*, 2001; Muenzner *et al.*, 2002). De plus, il a été observé que l'IFN- γ , mais pas l'IL-1 β , le LPS ou des bactéries vivantes augmentaient l'expression des molécules CEACAM1 et CEACAM6 à la surface des cellules cancéreuses du côlon humain tout en favorisant leur différenciation cellulaire (Fahlgren *et al.*, 2003). Par ailleurs, cette augmentation d'expression suite à un traitement par l'IFN- γ serait provoquée par l'activation du facteur 1 de régulation de l'interféron (IRF-1) (Chen *et al.*, 1996).

Au contraire, dans le cas du modèle murin d'infection par le virus MHV3, il a été montré que l'addition d'IFN- γ à des macrophages provenant de souris résistantes A/J permettait une diminution de la synthèse des ARN viraux de même que la synthèse des nouvelles particules virales. Cette résistance serait due à une diminution de l'expression du récepteur Bgp1 (maintenant appelé CEACAM1) par l'IFN- γ (Vassao *et al.*, 2000).

2.6- Les récepteurs viraux non spécifiques des coronavirus

2.6.1- Les régions riches en héparanes sulfates

Les glycosaminoglycans sont des chaînes linéaires de disaccharides répétés pour lesquels un des résidus consiste en l'acide hexuronique (l'acide D-glucuronique ou l'acide L-iduronique) et l'autre résidu, la D-glucosamine ou la D-galactosamine (Poiesi *et al.*, 2007). Les glycosaminoglycans peuvent être divisés en 4 sous-populations soient les héparines et les héparanes sulfates, les chondroïtines et dermatanes sulfates, les kératanes sulfates et finalement, l'acide hyaluronique (Poiesi *et al.*, 2007). Les héparanes sulfates pourraient théoriquement être constitués de plus de 48 disaccharides différents, mais seulement 23 structures ont pu être identifiées *in vivo* (Esko et Selleck, 2002).

Cette hétérogénéité structurale permettrait aux héparanes sulfates d'interagir avec plusieurs protéines fonctionnelles, telles que les facteurs de croissance, les cytokines, les chimiokines, les lipases, les protéases et les molécules d'adhésion cellulaire (Parish, 2006). Effectivement, il a été montré que les IL-1 β , IL-2, IL-4, TNF- α et IFN- γ pouvaient se lier aux régions héparanes sulfates dans des conditions de pH physiologique (Fernandez-Botran *et al.*, 1999) et que certaines cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 et le TNF- α , pouvaient augmenter l'expression des molécules d'héparanes sulfates à la surface des cellules endothéliales vasculaires (Clasper *et al.*, 1999; Gotte, 2003). De plus, il y aurait trois façons par lesquelles les héparanes sulfates contrôlraient les fonctions des chimiokines. Dans un premier temps, les chimiokines seraient protégées de la protéolyse par liaison avec les héparanes sulfates (Webb *et al.*, 1993; Sadir *et al.*, 2004). Également, ces régions joueraient un rôle dans l'immobilisation des chimiokines à la surface des cellules endothéliales vasculaires permettant la création d'un gradient de concentration (Middleton *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002). Finalement, le transport actif des chimiokines au travers des cellules endothéliales (phénomène de transcytose) serait dépendant des héparanes sulfates (Middleton *et al.*, 1997). Les héparanes sulfates seraient donc particulièrement impliquées dans le processus de transmigration des leucocytes (diapédèse) au travers des cellules endothéliales. De même, il est connu que les sélectines-L et sélectines-P pourraient interagir avec les héparanes sulfates favorisant cette transmigration cellulaire (Gotte, 2003; Parish, 2006).

Il est également connu que les récepteurs héparanes sulfates jouent un rôle critique dans l'infectivité de plusieurs virus, particulièrement au niveau de l'attachement viral. Effectivement, ces régions pourraient servir de facteur d'attachement de faible spécificité (Liu et Thorpe, 2002), de récepteur d'attachement spécifique (Liu et Thorpe, 2002) ou de récepteur provoquant la fusion membranaire (Tiwari *et al.*, 2004). Des études ont montré que le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) utilisait les régions riches en héparanes sulfates pour fusionner avec la membrane cellulaire (Tiwari *et al.*, 2004). Également, la protéine p17 du virus de l'immunodéficience humaine de type 1

(HIV-1) se lierait à l'héparane sulfate provoquant l'activation des lymphocytes T CD4⁺ (Poiesi *et al.*, 2007).

Bien que la molécule CEACAM1 soit considérée comme le récepteur spécifique reconnu des MHV, certaines études ont montré que les coronavirus pouvaient utiliser des régions riches en héparanes sulfates comme voie d'entrée ou d'activation cellulaire. Le virus IBV, un coronavirus aviaire, de concert avec l'acide sialique, peut se lier à l'héparane sulfate afin de permettre une fixation virale adéquate (Madu *et al.*, 2007). Le MHV-A59 peut aussi se fixer à cette molécule, mais seulement lorsque la protéine de surface a subi des mutations après plusieurs passages *in vitro*. Ces mutations seraient suffisantes pour permettre un changement d'un tropisme restreint à la molécule CEACAM1 à un tropisme plus large relié aux régions riches en héparanes sulfates. Cette voie d'attachement et d'entrée peut également être augmentée ou inhibée par l'ajout d'héparinase ou d'héparine respectivement (de Haan *et al.*, 2005). La région aminoterminal de la protéine S, plus précisément le site de liaison au récepteur CEACAM1 et la partie centrale de la protéine S, contenant entre autres la région HR1, serait importante dans le tropisme lié aux héparanes sulfates (de Haan *et al.*, 2006). Cependant, une étude effectuée avec le virus neurotrophique MHV-JHM a permis de démontrer que le mutant *sr7*, qui n'est plus en mesure de se lier au récepteur CEACAM1 et qui ne peut infecter les cellules permissives BHK, a la capacité de se lier à des régions riches en héparanes sulfates sans toutefois entrer dans la cellule-cible. Les auteurs ont donc proposé que les régions riches en héparanes sulfates ne seraient pas des facteurs cellulaires utilisés lors d'une infection indépendante du récepteur CEACAM1 (Watanabe *et al.*, 2007).

2.6.2- Les récepteurs Toll-like (TLR)

La réponse immunitaire innée est en mesure d'initier une défense cellulaire basée sur la reconnaissance non clonale de constituants microbiens. Cette détection est permise par des motifs conservés, appelés PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), exprimés par une grande variété de micro-organismes pathogènes. Ces motifs incluent la flagelline, le peptidoglycan, le LPS et les ARNdb. Les TLRs et Nod (nucleotide-binding

oligomerization domain) sont deux classes de récepteurs impliqués dans la reconnaissance des bactéries et dans l'activation de la réponse immunitaire innée (Athman et Philpott, 2004). Les PAMPs sont reconnus par différentes cellules du système immunitaire dont entre autres, les monocytes/macrophages, les cellules NK et les cellules dendritiques (Mukhopadhyay *et al.*, 2004). Cependant, certaines cellules, telles que les cellules épithéliales du tractus gastrointestinal, semblent être insensibles à plusieurs PAMPs. En effet, certaines études ont montré que ces cellules n'exprimaient pas ou très faiblement les TLRs à leur surface ou les co-récepteurs permettant la reconnaissance adéquate des PAMPs et l'induction de la signalisation intracellulaire (Abreu *et al.*, 2001; Backhed *et al.*, 2003).

Les TLRs sont des protéines transmembranaires de type 1 possédant au niveau extracellulaire un domaine riche en leucine et au niveau intracellulaire, un domaine TIR (Toll/IL-1R gene homology) (Athman et Philpott, 2004). Cependant, certains TLRs ne se retrouvent pas à la surface de la cellule, mais sont plutôt exprimés dans des vésicules intracellulaires. Il s'agit des TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 (Kajita *et al.*, 2006). Il existe chez l'humain 10 TLRs différents et chacun de ces récepteurs est en mesure de reconnaître des constituants étrangers particuliers. Les plus connus sont les TLR2, TLR3, TLR4 et TLR7 qui reconnaissent respectivement les lipoprotéines bactériennes (peptidoglycan), les ARNdb, le LPS et les ARNsb (Athman et Philpott, 2004; Mukhopadhyay *et al.*, 2004). Plusieurs mécanismes ont été proposés par lesquels les TLRs pouvaient discriminer les antigènes du soi et du non-soi. Ces mécanismes incluent les interactions homophiliques et hétérophiliques entre TLRs ou encore l'interaction entre un TLR et un récepteur non-TLR impliqué dans la défense innée (Mukhopadhyay *et al.*, 2004).

La signalisation intracellulaire induite lors de la reconnaissance du TLR avec son ligand est médiée par plusieurs molécules considérées comme des « adaptateurs ». La majorité des TLRs utilisent la molécule MyD88 (myeloid differentiation factor 88) afin de transmettre le signal au niveau intracellulaire (Takeda *et al.*, 2003). Cette molécule permet le recrutement de différents isoformes d'IRAK (IL-1R-associated kinase) qui, associés à TRAF-6 (TNF receptor-associated factor 6), activeront les molécules JNK et

NF- κ B, permettant finalement la transcription des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (Athman et Philpott, 2004). Les voies de signalisation induites par les TLR3 et TLR4 peuvent toutefois être MyD88-indépendantes. En effet, bien qu'aucune activation du NF- κ B et des cytokines inflammatoires n'ait été notée chez des souris MyD88^{-/-} traitées avec du LPS, la production d'IFN- β induite par la molécule IRF-3 reste tout à fait normale (Kawai *et al.*, 1999). Les molécules TIRAP (Toll/IL-1R domain-containing adaptor protein), mieux connues sous le nom de « Mal » sont d'autres adaptateurs qui seraient impliqués dans les voies de signalisation MyD88-indépendantes induites par les TLR2 et TLR4, mais non pas par les TLR3, TLR5 ou TLR9 (Horng *et al.*, 2001; Fitzgerald *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2002; Horng *et al.*, 2002). Les molécules TRIF (TIR-containing adaptor-inducing IFN- β) seraient plutôt impliquées dans les voies de signalisation MyD88-indépendantes induites par les TLR2 et TLR3 pour la production d'IFN- β (Yamamoto *et al.*, 2003a). Finalement, les molécules TRAM (TRIF-related adaptor molecule) exerceraient un rôle similaire aux molécules TRIF, à l'exception du fait qu'elles seraient limitées au TLR4 seulement (Yamamoto *et al.*, 2003b). Une étude a montré que les TLRs pouvaient être régulés négativement par les récepteurs Fc γ . Effectivement, la liaison du récepteur Fc γ à la surface des macrophages ou des lymphocytes B induirait une réponse anti-inflammatoire, réduisant l'activation des TLRs présents chez ces cellules (D'Andrea *et al.*, 1995; Sutterwala *et al.*, 1998).

Dans le domaine de la virologie, les chercheurs ont souvent associé à un virus la notion de récepteur spécifique et de co-récepteur. Cependant, certains récepteurs ne sont pas nécessairement impliqués dans la fixation et l'entrée virale dans la cellule-cible. En effet, certains récepteurs non-spécifiques, tels que les TLRs peuvent agir comme des inducteurs de cytokines inflammatoires. Il a été démontré que les molécules TLR2 et CD14 étaient en mesure de servir de site de fixation à la protéine d'enveloppe du cytomégalovirus humain (HCMV) et d'induire la libération de cytokines inflammatoires via l'activation du NF- κ B (Compton *et al.*, 2003). Le virus HSV-1 est également en mesure d'interagir avec les TLR2 et TLR9, mais non pas avec le TLR4 dans la production de médiateurs inflammatoires, dont la molécule MCP-1. Par ailleurs, la

mortalité des souris infectées avec le HSV-1 peut être grandement diminuée lorsque le gène codant pour le TLR2 est déficient (Kurt-Jones *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2006). Des composants viraux autres que la protéine de surface peuvent également reconnaître des TLRs. Dans le cas du HBV, les protéines constituant la capside sont en mesure d'induire la libération de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-12p40 par sa fixation au TLR2. Cette activation serait également dépendante des voies de signalisation p38 et ERK-1/2 MAPK de même que de celle du NF- κ B (Cooper *et al.*, 2005). La protéine « core » et la protéine non-structurale NS3 du HCV peuvent aussi induire une réponse inflammatoire via le TLR2 chez des macrophages. Cette induction serait favorisée par l'activation des molécules IRAK, p38 et ERK-1/2 MAPK, JNK, NF- κ B et AP-1 (Dolganiuc *et al.*, 2004). Par ailleurs, les concentrations élevées de TNF- α dans le sérum des patients infectés chroniquement par le HCV seraient dues à l'augmentation de l'expression du TLR2 à la surface des monocytes, mais non pas à celle du TLR4 (Riordan *et al.*, 2006).

Une dérégulation des cytokines a été proposée afin d'expliquer la sévérité de la réponse inflammatoire induite lors d'une infection par le virus du SARS. En fait, il a été observé que le facteur suppresseur de cytokines SOCS3 était diminué lors d'une infection des cellules épithéliales intestinales Caco2 par le virus du SARS. Par ailleurs, les niveaux d'IL-6 étaient relativement élevés lors de cette même infection. Cette régulation serait corrélée avec l'expression des récepteurs TLR4 et TLR9, qui est augmentée lors d'une infection par le virus du SARS (Okabayashi *et al.*, 2006). Il est également connu que la pathogénèse des infections induites par les coronavirus murins et humains implique les interférons de type 1 (α et β) (Yilla *et al.*, 2005; Cheung *et al.*, 2005) et de type 2 (Moreira *et al.*, 2004). Lors d'une infection par le virus MHV-A59, les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont en mesure de contrer la réplication virale via la production d'IFN- α . Cette induction serait médiée par l'interaction du TLR7 avec l'ARN viral présent au niveau intracytoplasmique lors de la réplication (Cervantes-Barragan *et al.*, 2007).

2.7- Hypothèses

Le virus de l'hépatite murine de type 3 constitue un modèle unique dans l'étude des différents problèmes immunopathologiques reliés aux hépatites virales. De plus, comme le virus MHV3 appartient à la famille des coronavirus, il peut servir de modèle pour l'identification des mécanismes impliqués dans les processus d'inflammations aiguës, dont ceux induits par le virus du SARS. L'objectif principal de ce travail est d'identifier les voies de défense immunitaire innée impliquées dans l'hépatite aiguë induite par le virus MHV3 chez les souris susceptibles génétiquement C57BL/6.

A) Nous avons montré dans la revue de la littérature que les cellules NK, provenant de la moelle osseuse et de la rate, sont rapidement recrutées dans le foie lors d'une infection virale (Wang *et al.*, 2005). L'importance des cellules NK est mise en évidence à l'aide du modèle de l'hépatite aigue induite chez la souris C57BL/6 par le coronavirus MHV3. Ainsi, il a été montré que l'élimination *in vivo* des cellules NK chez la souris infectée par le virus MHV provoquait une aggravation de l'hépatite (Bukowski *et al.*, 1983). De plus, il avait précédemment été observé que les cellules NK spléniques recrutées au niveau du foie des souris infectées par le virus MHV-JHM exerçaient leur activité cytotoxique mais sans la production d'IFN- γ (Stohlman *et al.*, 1983). Ainsi, ces observations suggèrent des déficits fonctionnels des cellules NK recrutées dans le foie lors de l'hépatite aiguë induite, ce qui favoriseraient l'aggravation de cette hépatite.

B) Dans le modèle de l'hépatite aiguë induite par le MHV3, il a été montré que les populations intrahépatiques $NK1.1^+ \alpha\beta TCR^-$ et $NK1.1^+ \alpha\beta TCR^{inter}$ (NK-T) diminuaient alors que les cellules $CD4^+ \alpha\beta TCR^{inter} LFA-1^+$ augmentaient dans le foie de souris infectées par le virus L2-MHV3 dans les trois premiers jours de l'infection (Lamontagne *et al.*, 1997; Lamontagne *et al.*, 2001). Ces modifications dans les populations lymphocytaires intrahépatiques pourraient résulter d'un débalancement de l'équilibre entre l'état de tolérance hépatique et la réponse inflammatoire suite à l'infection virale. Les hépatocytes, les LSEC et les KC sont des cellules-cibles pour le virus MHV3 et peuvent être rendues dysfonctionnelles suite à l'infection virale (Martin *et al.*, 1994). Le rôle de ces cellules dans le développement de l'hépatite aiguë est

renforcé par le fait que des variants viraux ayant perdu leur capacité à infecter l'une ou l'autre de ces cellules-cibles induisent des hépatites de gravité réduite (Martin *et al.*, 1994). Comme l'état de tolérance hépatique est sous le contrôle des LSEC et/ou des KC qui sécrètent des cytokines immunosuppressives, il est suggéré que la susceptibilité des LSEC et des KC à l'infection virale régulerait anormalement les sous-populations NK et NK-T de même que la production des cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10, le TGF- β et la PGE₂.

C) Il a été démontré que l'injection d'IL-12 et d'IL-18 à des souris susceptibles les protégeait contre une infection par le virus MHV3 suite à l'augmentation d'IFN- γ (Moreira *et al.*, 2004). Cependant, la ou les cellule(s) responsable(s) de cette protection n'a (ont) pas été identifiée(s). De plus, les cellules NK recrutées au niveau du foie lors d'une infection par le virus MHV-JHM n'étaient plus en mesure de sécréter de l'IFN- γ (Stohlman *et al.*, 1983). La production de l'IL-12 et de l'IL-18 intrahépatique dépend principalement de l'intégrité des KC, des LSEC et des cellules dendritiques, mais ces cellules, exprimant le récepteur CEACAM1a, sont aussi des cibles pour l'infection virale (Martin *et al.*, 1994; Coutelier *et al.*, 1994; Godfraind et Coutelier, 1998). Il est également connu que la production d'IFN- γ chez des cellules NK en présence des IL-12 et IL-18 nécessite l'activation de plusieurs molécules dont les ITAMs, et des voies de signalisation p38 et ERK MAPK (Ortaldo *et al.*, 2006). D'autre part, la réplication des virus MHV serait dépendante de l'activation de la voie p38 MAPK (Banerjee *et al.*, 2002). En conséquence, il est proposé que l'hépatite aiguë induite par le virus MHV3 soit associée à une diminution des niveaux hépatiques d'IL-12 et d'IL-18, responsables d'une diminution ou de l'absence de production d'IFN- γ . Ainsi, l'addition d'IL-12 et d'IL-18 recombinantes à des cellules NK pourrait induire une production d'IFN- γ , une production qui pourrait être augmentée par l'activation de la voie p38 MAPK suite à l'induction de la réplication virale.

D) D'autre part, l'hépatite aiguë reflète l'induction d'une réponse inflammatoire rapide pouvant résulter d'une forte augmentation de cytokines inflammatoires. Il a été observé que le virus du SARS, un coronavirus humain, pouvait induire une forte réponse

inflammatoire, caractérisée par une production élevée d'IL-6 et de TNF- α (Drosten *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007), mais les mécanismes responsables ne sont pas connus. Il est proposé que :

- 1) La fixation du virus MHV3 à son récepteur spécifique, la molécule CEACAM1a, pourrait moduler la production de ces cytokines.
- 2) D'autre part, les virus MHV seraient en mesure d'induire une réponse inflammatoire par l'activation de certains TLRs.
- 3) Les régions riches en héparanes sulfates pourraient également agir comme des récepteurs non spécifiques pour des coronavirus via leur protéine S.

Donc, l'hépatite aiguë induite par le virus MHV3 serait alors engendrée par une production accrue d'IL-6 et de TNF- α dépendante de la fixation de la protéine virale S sur des régions riches en héparanes sulfates et sur la molécule TLR2 à la surface des cellules de type macrophagique et modulée par l'engagement de la molécule CEACAM1a.

Dans cette thèse, ces hypothèses seront donc étudiées et les résultats seront présentés sous forme d'un article soit publié, accepté ou soumis.

3- RÉSULTATS

3.1- Article 1

L'objectif de cet article était de démontrer que l'hépatite aiguë induite chez la souris susceptible C57BL/6 par le virus pathogène L2-MHV3 pouvait engendrer une déficience au niveau de la réponse immunitaire innée, particulièrement celle des cellules NK, provoquant ainsi une mortalité rapide des souris susceptibles. L'originalité de cet article a été de démontrer pour la première fois que les cellules NK myéloïdes pouvaient être infectées par un virus MHV. De plus, cet article a mis en évidence que les cellules NK recrutées de la moelle osseuse et de la rate pouvaient jouer un rôle essentiel dans la protection antivirale durant une hépatite aiguë. Également, il a été possible de montrer que l'IL-15 possédait un rôle important dans la survie des cellules NK au cours de l'infection par un virus MHV. En fait, la permissivité des cellules NK à l'infection par les coronavirus n'avait jamais été envisagée et cette découverte a permis à d'autres chercheurs de mettre en évidence la présence de la molécule CEACAM1 chez ces cellules.

Mon rôle dans cet article a été d'effectuer et d'analyser les expériences présentées par les figures 8c, 9 et 10. Plus particulièrement, j'ai travaillé au niveau de l'activité cytotoxique des cellules NK intrahépatiques *in vivo* ainsi que sur l'effet de l'IL-15 sur l'apoptose des cellules NK intrahépatiques et myéloïdes *in vitro*.

MURINE VIRAL HEPATITIS INVOLVES NK CELL DEPLETION ASSOCIATED
WITH VIRUS-INDUCED APOPTOSIS

M. LEHOUX, A. JACQUES, S. LUSIGNAN, & L. LAMONTAGNE

Département de microbiologie et d'immunologie

Université de Montréal, Canada

Publié dans la revue *Clinical and Experimental Immunology* (2004)

Volume 137, pp 41-51

3.1.1- Abstract

Mouse hepatitis virus type 3 (MHV3), a coronavirus, is an excellent animal model for the study of immunological disorders related to acute and chronic hepatitis. In this study, we have verified if the fulminant hepatitis induced by MHV3 could be related to an impairment of innate immunity. Groups of three C57BL/6 mice were infected with the pathogenic L2-MHV3 or attenuated YAC-MHV3 viruses, and the natural killer (NK) cell populations from liver, spleen and bone marrow were analysed. The percentage of intrahepatic NK1.1⁺TCR⁻ cells did not increase while NK1.1⁺TCR^{inter} cells decreased in both L2-MHV3- and YAC-MHV3-infected mice. Concurrently, splenic and myeloid NK1.1⁺ cells decreased in L2-MHV3-infected mice. However, the cytotoxic activity of NK cells increased in liver and decreased in bone marrow from pathogenic L2-MHV3-infected mice while no modification was detected in YAC-MHV3-infected mice. Flow cytometric analysis revealed that both normal and larger splenic or myeloid NK cells decreased more in pathogenic L2-MHV3-infected mice than in attenuated YAC-MHV3-infected mice. *In vitro* viral infections of interleukin (IL)-15-stimulated lymphoid cells from liver and bone marrow revealed that L2-MHV3 induced higher decreases in cell viability of NK1.1⁺ cells than the YAC-MHV3 variant. The NK cell decreases were due to the viral permissivity leading to cytopathic effects characterized by cell rounding, syncytia formation and apoptosis. Larger NK⁺ syncytia were observed in L2-MHV3-infected cells than in YAC-MHV3-infected cells. These results suggest that NK cell production is impaired by viral infection favouring fulminant hepatitis.

3.1.2- Introduction

Hepatitis is an inflammatory state induced by various causes, such as bacteria and viruses. The viral persistence in liver is associated with a chronic hepatitis leading to cirrhosis, hepatic carcinoma and death (Briton et Nathanson, 1981; Byrne et Oldstone, 1985; Sissons et Borysiewicz, 1985). The role of natural killer (NK) cells is to provide a first line of defence against bacteria, tumour cells and virus-infected cells through the

exertion, without priming, of a cytotoxic function as well as a production of interferon (IFN)- γ (Herberman, 1982; Gosselin *et al.*, 1999). However, the fulminance of the hepatitis cannot result from a deficiency in antiviral adaptive immune responses following a decrease in T and B lymphoid cells. Acute hepatitis suggests a virus-mediated deficiency in innate immunity mechanisms. It was reported recently that the hepatitis C envelope protein can bind to natural killer (NK) cells and impair their cytotoxic properties and IFN- γ production, thus altering the host's natural defences and innate immunity against viral hepatitis (Crotta *et al.*, 2002; Tseng et Klimpel, 2002). The liver contains a population of NK cells and a unique population of T cells with an intermediate level of $\alpha\beta$ -T cell receptor (TCR) cells expressing the NK1.1 marker (NK-T cells) (Watanabe *et al.*, 1995; Tsukahara *et al.*, 1997). The level of NK cell subsets in the liver during the first days of the infection depends on both their recruitment from peripheral lymphoid organs and the efficiency of NK cell production by the bone marrow. NK cells are large granular lymphocytes derived from bone-marrow (BM) progenitor cells which require an intact microenvironment as well as interleukin (IL)-15 production for their complete maturation into lytic cells (Moore *et al.*, 1996; Puzanov *et al.*, 1997). The role of intrahepatic NK cells in the viral hepatitis process is not elucidated.

Mouse hepatitis virus type 3 (MHV3) is an excellent animal model for the study of immunological disorders related to hepatitis. The MHV3 virus induces acute and/or chronic hepatitis associated with viral persistence and immunodeficiency (Le Prevost *et al.*, 1975; Levy-Leblond *et al.*, 1979). Sensitivity of mice to MHV3 infection varies according to the strain, age and immune status of the animal. Development of a fulminant hepatitis in susceptible C57BL/6 mice which leads to the death of the animal within 3-5 days post-infection (p.i.) is accompanied by a loss of T lymphocytes in spleen and thymus as well as a decrease of splenic and myeloid B lymphocytes (Dupuy *et al.*, 1975; Jolicoeur et Lamontagne, 1989; Lamontagne *et al.*, 1989b). We have previously generated an attenuated viral variant, the YAC-MHV3, which induces a subclinical hepatitis in susceptible C57BL/6 mice without inducing immune disorders in the lymphoid organs, including bone marrow, and in T and B lymphocytes (Lamontagne et

Dupuy, 1984; Jolicoeur et Lamontagne, 1989; Lamontagne *et al.*, 1989b; Lamontagne et Jolicoeur, 1991).

We have reported previously that intrahepatic mononuclear cells increased in the liver of L2-MHV3-infected mice within 3 days of infection but not in attenuated YAC-MHV3-infected mice (Lamontagne *et al.*, 1997; Lamontagne *et al.*, 2001). Percentages of intrahepatic CD4⁺TCR^{inter} and CD4⁺TCR^{high} cell subsets increased in C57BL/6 mice infected with the pathogenic L2-MHV3 but not in liver from the attenuated YAC-MHV3-infected mice. However, percentages of intrahepatic total NK cells did not increase in either L2-MHV3- or YAC-MHV3-infected mice. The biological significance of intrahepatic NK cells unresponsiveness has not yet been elucidated.

Controversial results on the protective role of NK cells in MHV infections were reported 20 years ago. At that time, it was observed that NK cell activity increased in peritoneal exudates from MHV3-infected C57BL/6 mice suggesting that NK cells did not play an important role in the defence of mice against MHV3 infection (Schindler *et al.*, 1982; Stohlman *et al.*, 1983). Stohlman *et al.* (1983) have observed no IFN- γ production in spite of increase of NK cell cytotoxicity favouring viral replication as it was demonstrated that IFN- γ is involved in the protection against MHV3-induced hepatitis (Mello *et al.*, 1993). In addition, NK depletion increased both inflammatory foci and virus titres in the liver of MHV-infected mice (Bukowski *et al.*, 1983). On the other hand, the natural resistance of A/J mice to the fulminant hepatitis induced by MHV3 has been shown to depend on a bone marrow subpopulation showing features similar to those of NK cells (Tardieu *et al.*, 1980). This observation suggests that the integrity of the bone marrow may play a crucial role in the resistance against the acute phase of hepatitis through the production of NK cells. Taken together, these observations suggest that NK cell disorders may be involved in pathogenic L2-MHV-infected mice. In this context, the maturation process of NK cells in bone marrow could be impaired in pathogenic L2-MHV3-infected mice, as demonstrated previously for myeloid pre-B and B lymphocytes (Jolicoeur et Lamontagne, 1989), leading to a

decreased production of cytotoxic NK cells and lower recruitment of NK cells to the liver.

In this paper, we report that NK cell production by the bone marrow and NK cell recruitment by the liver are impaired differently by pathogenic and attenuated viral strains due to virus-induced cell death and apoptosis.

3.1.3- Materials and methods

3.1.3.1- Mice

C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories (St-Constant, Quebec, Canada). Before being used, the animals were tested for the presence of anti-MHV3 antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an MHV3 preparation as antigen. During the experiments, the animals were housed in a sterile atmosphere (Forma Scientific, Marietta, OH, USA). Female mice between 8 and 12 weeks of age were used in all experiments.

3.1.3.2- Viruses

Pathogenic MHV3 was a cloned substrain produced in L2 cells (L2-MHV3) as described previously (Dupuy et Rodrigue, 1981). The YAC-MHV3 variant was a cloned virus derived from persistently infected lymphoid YAC cell (Lamontagne et Dupuy, 1984). Viruses were produced on L2 cells before use and their pathogenic properties were verified regularly.

3.1.3.3- *In vivo* viral infection

Groups of three mice were infected intraperitoneally (i.p.) with 1000 TCID₅₀ of pathogenic L2-MHV3 or attenuated YAC-MHV3. Mock-infected mice received a similar volume of RPMI-1640 (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY, USA). At

various times post-infection (p.i.), mice were killed by CO₂ anoxia. Liver, spleen and bone marrow were collected and lymphoid cells were isolated.

3.1.3.4- Cells

L2 cells, a continuous mouse fibroblast cell line, were grown in RPMI-1640 supplemented with glutamine (2 mM), antibiotics (penicillin, 100 U/ml and streptomycin, 100 mg/ml) (GIBCO Laboratories) and 5% fetal calf serum (FCS) (HyClone Laboratories, Professional Diagnostics, Alberta, Canada). L2 cells were used for virus propagation and titration.

YAC-1 cells, a continuous mouse lymphocyte cell line, were grown in RPMI-1640 with glutamine (2 mM), antibiotics (penicillin, 100 U/ml and streptomycin, 100 mg/ml) and 10% FCS. These cells were used as target cells in the cytotoxicity assays.

Intrahepatic mononuclear cells (MNC) were isolated from the livers of three mice in each experimental group or from uninfected mice according to experiments, as described previously (Lamontagne *et al.*, 1997). Livers were pressed through a 70 μ m cell strainer, which was then washed with 20 ml of RPMI-1640 (GIBCO Laboratories) containing 20% FCS and antibiotics. The cell suspensions were then deposited over a 5 ml cushion of FCS to allow debris sedimentation. The top layer was then centrifuged on a discontinuous Percoll gradient [45%, 67% Percoll in phosphate buffered saline (PBS); Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden] for 30 min at 1000g. MNC were collected at the interface of the 45% and 67% Percoll layers. The cells were then washed in RPMI-1640 containing 20% FCS and counted electronically (Coulter Counter, Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA).

Splenic lymphocytes were obtained from three mice in each experimental group. Spleens were pressed through a 70 μ m cell strainer (Falcon, Fisher Scientific Co., Montreal, Canada) and collected in RPMI-1640 supplemented with 20% FCS.

Bone marrow lymphocytes were isolated from the femurs of three mice from each experimental group or from uninfected mice, according to experiments. Femurs were left in 70% ethanol for 2-5 min for disinfection and washed subsequently with RPMI-1640. The femurs were then excised from the surrounding muscle tissue, both ends were cut with scissors and the marrow was flushed using a syringe filled with RPMI-1640 and fitted with a 0,45 mm diameter needle. Clusters within the bone marrow suspension were dissociated by vigorous pipetting. The cell suspensions were then deposited over a 5 ml cushion of FCS to allow debris sedimentation.

Splenic and myeloid cell suspensions were enriched in lymphocytes by passage through a Lymphoprep gradient (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada). The cell suspensions were then washed, resuspended in RPMI-1640 with 20% FCS and counted electronically.

3.1.3.5- *In vitro* viral infection in NK cells

Lymphocytes were isolated from the liver or bone marrow of groups of four to six mice, as described above, and pooled together. Cells were seeded in 24-well plates at a concentration of 10^6 cells/ml in RPMI-1640 media supplemented with antibiotics and 20% FCS. Recombinant murine IL-15 (rmIL-15) (Endogen, Woburn, MA, USA) was added at a final concentration of 20 ng/ml. The plates were incubated at 37°C, under 5% CO₂ atmosphere for 7 days, and were then infected with 0,1-1 multiplicity of infection (m.o.i.) of L2-MHV3 or YAC-MHV3 viruses. The plates were then incubated for an additional 24 hrs. Non-adherent cells were collected, counted electronically and immunolabelled for flow cytometric analysis.

3.1.3.6- Flow cytometric analysis

Percentages and number of events of myeloid and splenic NK1.1⁺ and B220⁺ cells were determined by a double immunolabelling: 10^6 cells were resuspended in 1 ml of RPMI-1640 containing 20% FCS, and incubated on ice for 30 min with optimal

dilutions of antimouse NK1.1-phycoerythrin (PE) (clone PK136, mouse IgG2 κ , Pharmingen, Toronto, Canada) and antimouse CD45R/B220-fluorescein isothiocyanate (FITC) (clone RA3-6B2, rat IgG2 κ , Pharmingen) or FITC-anti- $\alpha\beta$ -TCR (clone H57-597, Pharmingen) monoclonal antibodies (mAbs). Cells were then washed in RPMI-1640 containing 20% FCS and fixed overnight at 4°C in PBS, pH 7.2, containing 1% formaldehyde (Fisher Scientific). Flow cytometric analysis was performed on a fluorescence-activated cell sorting flow cytometer (FACScan) with Cell Quest software (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA). Ten thousand cells were analysed per sample and percentages of various subpopulations were determined by a multiparametric analysis.

3.1.3.7- Virus titration

Liver, spleen, bone marrow from infected mice and infected rmIL-15-stimulated myeloid cells were kept frozen at -70°C until titration. The organs were then thawed, triturated in RPMI-1640 medium and centrifuged while the cells were thawed and centrifuged. The supernatants were used as viral suspension. They were then serially diluted in 10-fold steps using RPMI-1640 and tested on L2 cells cultured in 96-well microtitre plates. Cytopathic effects, characterized by syncytia formation and cell lysis, were recorded at 72 hrs p.i. and virus titres expressed as log₁₀ TCID₅₀. All titrations were performed in triplicate.

3.1.3.8- TUNEL test

Infected rmIL-15-stimulated myeloid cells were collected, washed, counted electronically and adjusted to a concentration of 10⁶ cells/ml before being cytocentrifuged on coated glass slides (100 μ l PBS with 5% BSA for 10 min, 1500 rpm) (Cytospin, Shandon Southern Instruments, Sewickly, PA, USA) for 5 min at 1100 rpm. The slides were then prepared as indicated on the commercial kit (Boehringer Mannheim, Laval, Canada). Briefly, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min at room temperature and washed twice in PBS. Cells were then permeabilized for 2 min at 4°C using a 0.1% sodium citrate buffer solution containing

0,1% Triton X-100 and washed twice in PBS. The cytoslots were stained with the TUNEL reagent for 60 min at 37°C in a humidified atmosphere. After washing, the slides were mounted in a medium containing 90% glycerol in PBS and 0,1% p-phenylenediamine (Fisher Scientific). A fluorescence microscope (Leitz Dialux 22, Ernst Leitz ltd., Midland, Ontario, Canada) was used for analysis. The percentage of positive cells was determined by counting 500 cells. A double immunolabelling using TUNEL-TMR (Boeringher Mannheim) and FITC-anti-Pan NK mAbs (clone DX5, Pharmingen) was also performed on *in vitro* infected myeloid lymphocytes. Experiments were conducted in triplicate.

3.1.3.9- Cytotoxic test

LDH release was used to measure NK cell cytotoxicity against YAC-1 cells (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Briefly, intrahepatic splenic and myeloid NK cells, extracted from three mice in each experimental group, were serially diluted using RPMI 1640 with 1% FCS and seeded on a 96-well tissue culture plate. The target cells, YAC-1 cells, were added to the first series of effector cells at an optimal concentration (effector–target cell ratio). In the second series, assay medium was added to the effector cells to determine their spontaneous lactate dehydrogenase (LDH) release (effector cell control). The absorbance of the treated supernatants was read at a wavelength of 490 nm. The percentage of cytotoxicity was determined as follows:

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{(\text{effector-target cell mix}) - (\text{effector cell control}) - (\text{low control})}{\text{high control} - \text{low control}} \times 100$$

3.1.3.10- Statistical analysis

Percentage differences were determined using Student's t test. Comparison was performed between cells from infected *versus* control mice for *in vivo* studies and

infected cells versus control cells for *in vitro* studies. Cytotoxicity test results were analysed by an ANOVA test.

3.1.4- Results

3.1.4.1- Viral replication of pathogenic L2-MHV3 and attenuated YAC-MHV3 viruses in liver, spleen and bone marrow from C57BL/6 mice

Replication of pathogenic L2-MHV3 and attenuated YAC-MHV3 viruses was assessed in liver, spleen and isolated bone marrow lymphoid cells from infected C57BL/6 mice. As shown in Table II, infectious viruses were produced as soon as 24 hrs in liver ($p < 0,05$), spleen ($p < 0,05$) and bone marrow ($p < 0,01$) from L2-MHV3-infected mice. Lower virus titres were detected in liver and bone marrow from YAC-MHV3 infected mice. The viral titres observed at 72 hrs p.i. in the liver ($p < 0,01$) and bone marrow ($p < 0,01$) of L2-MHV3-infected mice increased more than in those infected with YAC-MHV3 variant ($p < 0,01$ for the liver).

Table II. Infectious virus titers in liver, spleen and bone marrow from pathogenic L2-MHV3- and attenuated YAC-MHV3-infected C57BL/6 mice.

| Organ ¹ | Virus | Virus titres (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml) | |
|--------------------|----------|---|-------------|
| | | 24 hrs p.i. | 72 hrs p.i. |
| Liver | Control | <1,6 | <1,6 |
| | L2-MHV3 | 3,1 ± 0,5* | 5,2 ± 0,5** |
| | YAC-MHV3 | 2,1 ± 0,3 | 3,4 ± 0,4* |
| Spleen | Control | <1,6 | <1,6 |
| | L2-MHV3 | 2,3 ± 0,3* | 4,1 ± 0,5** |
| | YAC-MHV3 | <1,6 | 2,5 ± 0,3** |
| Bone marrow | Control | <1,6 | <1,6 |
| | L2-MHV3 | 2,8 ± 0,2** | 4,8 ± 0,5** |
| | YAC-MHV3 | 1,8 ± 0,3 | 2,3 ± 0,4 |

¹Three mice were used in each experimental group. *p<0,05, **p<0,01

3.1.4.2- NK1.1⁺ cell subsets from livers of C57BL/6 mice infected with pathogenic L2-MHV3 or attenuated YAC-MHV3 viruses

To verify if the fulminant hepatitis induced by the pathogenic L2-MHV3 strain in susceptible C57BL/6 mice is related to a deficiency in NK cell subsets, groups of three C57BL/6 mice were infected with 1000 TCID₅₀ of pathogenic L2-MHV3 or attenuated YAC-MHV3 variant. Mice were killed at 72 hrs p.i. and intrahepatic mononuclear cells were isolated. A macroscopic examination of the liver revealed that hepatic lesions were more extensive in L2-MHV3-infected mice than in YAC-MHV3-infected mice, as reported previously (Smith *et al.*, 1972; Lamontagne and Dupuy, 1984) (Table III). The number of mononuclear cells isolated from the livers was higher in L2-MHV3-infected

mice ($5,23 \pm 1,5 \times 10^6$ cells/liver) ($p < 0,001$) than in YAC-MHV3- or mock-infected mice ($1,5 \pm 1,2 \times 10^6$ and $1,2 \pm 0,2 \times 10^6$ cells/liver, respectively). The intrahepatic lymphoid cells were then phenotyped by double-immunolabellings with FITC-anti- $\alpha\beta$ -TCR and PE-anti-NK1.1 mAbs and the percentages of NK1.1⁺TCR⁻ (NK cells), NK1.1⁺TCR^{inter} (NK-T cells), NK1.1⁻TCR^{inter} and NK1.1⁻TCR^{high} were evaluated by flow cytometric analysis. Percentage of intrahepatic NK1.1⁺TCR⁻ cells did not increase in both L2-MHV3- and YAC-MHV3-infected mice while NK1.1⁺TCR^{inter} cells decreased ($p < 0,05-0,001$) (Table III). However, the absolute numbers of NK1.1⁺TCR⁻ and NK1.1⁺TCR^{inter} increased in L2-MHV3-infected mice ($p < 0,01$) but not in YAC-MHV3-infected mice. In contrast, the percentages of NK1.1⁻TCR^{inter} cells increased in the liver of L2-MHV3-infected mice only ($p < 0,001$), as reported previously (Lamontagne *et al.*, 1997). Absolute numbers of NK1.1⁺TCR^{inter} and NK1.1⁻TCR^{high} cells, however, increased strongly in L2-MHV3-infected mice (nine and three times, respectively) ($p < 0,001$) while the increase of NK1.1⁻TCR^{inter} cells was minor in YAC-MHV3-infected mice ($p < 0,05$).

Table III. Percentages and absolute numbers of NK1.1/ $\alpha\beta$ -TCR cell subsets in liver from mock-infected, L2-MHV3- and YAC-MHV3-infected C57BL/6 mice. Three mice were used in each experimental group.

| Organ | Hepatitis ¹ | % NK1.1 ⁺ cell subsets (absolute number x 10 ⁵) ² | | | |
|---------------|------------------------|---|---|---|--|
| | | NK1.1 ⁺ TCR ⁻ | NK1.1 ⁺ TCR ^{inter} | NK1.1 ⁻ TCR ^{inter} | NK1.1 ⁻ TCR ^{high} |
| Mock-infected | - | 5,3 ± 1,4 ³ (1,00 ± 0,27) | 17,0 ± 1,5 (3,21 ± 0,28) | 9,4 ± 1,2 (1,78 ± 0,23) | 8,1 ± 0,3 (1,53 ± 0,06) |
| L2-MHV3 | +++ | 6,5 ± 2,8 (5,43 ± 2,34)** | 8,4 ± 0,9** (7,01 ± 0,75)** | 20,1 ± 0,4** (16,8 ± 0,33)** | 7,0 ± 1,4 (5,8 ± 1,17)** |
| YAC-MHV3 | + | 5,1 ± 1,9 (1,49 ± 0,56) | 9,3 ± 0,5*** (2,72 ± 0,15) | 12,1 ± 1,4 (3,54 ± 0,41)* | 5,7 ± 2,3 (1,67 ± 0,67) |

1. Hepatitis was determined by a macroscopic examination of liver: + no discoloration, small necrotic foci; +++ discoloration, extensive necrotic foci; and high friability.
2. Intrahepatic lymphocytes were purified by Percoll gradient, double labeled with anti-NK1.1-PE and anti-TCR-FITC mAbs and analyzed using a FACScan flow cytometer. Lymphoid cells were gated according to FSC/SSC parameters, and cell numbers were evaluated based on a total of 10 000 recorded events. Absolute numbers were calculated by comparing the percentage of cells in each region with the total number of cells obtained from liver. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.
3. The relative percentages of cell subsets indicate their proportion in the liver, whereas the absolute numbers correspond to number of isolated cells by liver.

3.1.4.3- Splenic NK1.1⁺ and B cells from C57BL/6 mice infected with pathogenic L2-MHV3 or attenuated YAC-MHV3 viruses

To determine if the lower increase in NK⁺ cell subsets than other lymphoid cells (NK-T and T cells) in the liver from L2-MHV3-infected mice results from a deletion of peripheral NK cells, splenic cells were isolated from groups of three mice infected with L2-MHV3 or YAC-MHV3 viruses at 24 and 72 hrs p.i. Splenic lymphoid cells were then immunolabelled using anti-NK1.1-PE and anti-B220-FITC mAbs and analysed by flow cytometry. As shown in Fig. 6, two cell clusters were detected according to FSC/SSC parameters: one showing typical lymphoid FSC/SSC parameters (region R1: normal cells) and a second, characterized by an increased FSC parameter (region R2: large cells) (Fig. 6, section I). In Fig. 6 (sections I-A to I-C), the percentage of large cells (R2 region) increased in both infected groups of mice. Phenotypic analysis of splenic lymphoid cells revealed that the percentage of normal NK1.1⁺ cells increased slightly in YAC-MHV3-infected mice only (Fig. 6, sections I-D to I-F). In addition, the percentages of larger NK⁺ cells increased in L2-MHV3-infected mice while larger B220⁺ cells decreased (Fig. 6, sections I-G to I-I).

The statistical analysis of splenic NK1.1⁺ and B220⁺ cells in the groups of L2-MHV3- and YAC-MHV3-infected mice for 24 and 72 hrs p.i. indicated that the absolute numbers of both normal and larger NK1.1⁺ cells decreased strongly in L2-MHV3-infected mice as soon as 24 hrs p.i. ($p < 0,05-0,001$) (Fig. 6, sections II-A and II-B). The absolute numbers of large splenic NK1.1⁺ cells higher decreased in L2-MHV3- ($p < 0,01$) than in YAC-MHV3-infected mice at 72 hrs p.i. However, absolute numbers of both normal and large splenic B220⁺ lymphocytes decreased only in mice infected with the pathogenic L2-MHV3 strain ($p < 0,001$).

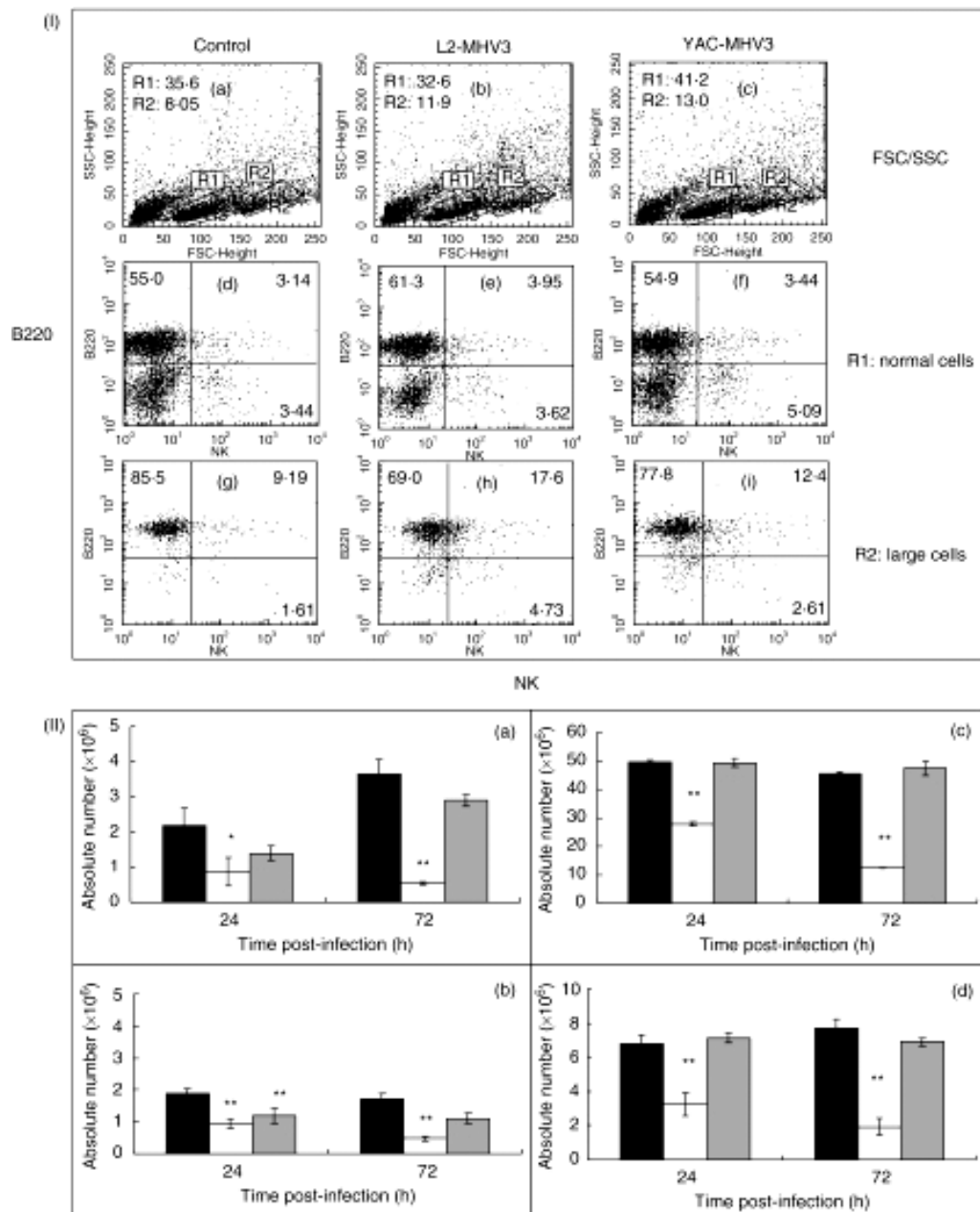


Figure 6. Section I- Flow cytometric analysis of normal (R1 region) (d, e, f) and larger (R2 region) (g, h, i) NK⁺ and B220⁺ lymphoid cells in spleen from mock-infected (a, d and g), and L2-MHV3- (b, e and h) and YAC-MHV3- (c, f and i) infected C57BL/6 mice at 72 hrs p.i. Myeloid lymphocytes were double-labelled using anti-NK1.1-PE and anti-B220-FITC mAbs and were analysed using a FACScan flow cytometer on a total of 10 000 events recorded. **Section II-** Absolute numbers of normal (a and c) and larger (b

and d) NK1.1⁺ cells (a and b) and B220⁺ lymphocytes (c and d) in spleen from mock-infected (■), L2-MHV3- (□) and YAC-MHV3- (▣) infected C57BL/6 mice at 24 hrs p.i. Splenic lymphocytes were double-labelled using anti-NK1.1-PE and anti-B220-FITC mAbs and were analysed using a FACScan flow cytometer on a total of 10 000 events recorded. The results are representative of three experiments. *p<0,05; **p<0,001.

3.1.4.4- Production of NK1.1⁺ and B220⁺ cells in bone marrow from mock-infected, L2-MHV3- and YAC-MHV3-infected mice

To verify if the loss of NK1.1⁺ cells in the spleen of L2-MHV3-infected mice reflects a lower production of NK1.1⁺ cells by the bone marrow, groups of C57BL/6 mice were then infected with either the pathogenic L2-MHV3 or the attenuated YAC-MHV3 and were killed at 24 and 72 hrs p.i. Myeloid lymphocytes were isolated, double-labelled with anti-NK1.1-PE and anti-B220-FITC mAbs and analysed by flow cytometry. Two distinct cell populations were observed according to their FSC/SSC parameters, similar to those seen previously in the spleen (Fig. 7). As shown in Fig. 7 (sections I-A to I-C), myeloid lymphoid cells are distributed in both the R1 (normal cells) and R2 (large cells) regions. The percentage of normal lymphoid cells (R1 region) from L2-MHV3-infected mice decreased while larger cells (R2 region) increased (Fig. 7, section I-B). Phenotypic analysis of bone marrow lymphoid cells revealed that the percentages of both normal and larger NK1.1⁺ cells decreased strongly in L2-MHV3 (Fig. 7, sections I-E and I-H) while the larger NK cells decreased less in YAC-MHV3-infected mice (Fig. 7, sections I-F and I-I). Normal B220⁺ cells increased in L2-MHV3-infected mice while larger B220⁺ cells rather decreased (Fig. 7, sections I-E and I-H).

The analysis of myeloid NK1.1⁺ and B220⁺ cells from groups of L2-MHV3- and YAC-MHV3-infected mice at 24 and 72 hrs p.i. indicated that the number of normal NK1.1⁺ cells decreased in the bone marrow from L2-MHV3-infected mice as soon as 24 hrs p.i. (Fig. 7, section II-A) (p<0,001). However, normal and larger NK1.1⁺ cells

decreased more at 72 hrs p.i. in L2-MHV3-infected mice only ($p < 0,001$) (Fig. 7, sections II-A and II-B). The numbers of larger B220⁺ cells from YAC-MHV3-infected mice increased at 24 hrs p.i. ($p < 0,05$) while normal and larger B220⁺ cells decreased at 72 hrs p.i. in L2-MHV3-infected mice only ($p < 0,01$ and $0,001$) (Fig. 7, sections II-C and II-D). Normal B220⁺ cells from YAC-MHV3-infected mice also decreased at 72 hrs p.i. ($p < 0,05$).

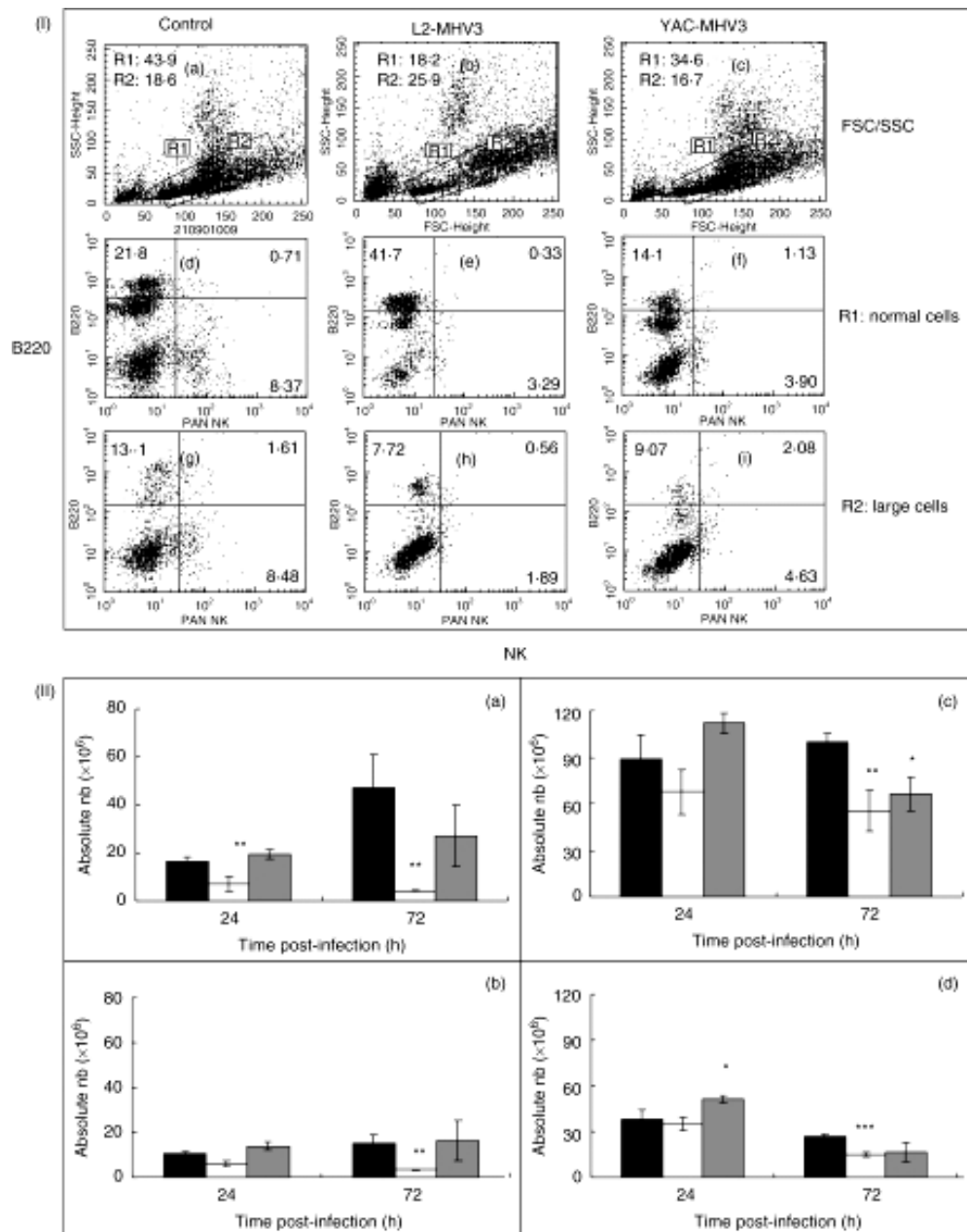


Figure 7. Section I- Flow cytometric analysis of normal (R1 region) (d, e, f) and larger (R2 region) (g, h, i) NK1.1⁺ and B220⁺ lymphoid cells in bone marrow from mock-infected (a, d and g) and L2-MHV3- (b, e and h) and YAC-MHV3- (c, f and i) infected C57BL/6 mice at 72 hrs p.i. Myeloid lymphocytes were double-labelled using anti-NK1.1-PE and anti-B220-FITC mAbs and were analysed using a FACScan flow cytometer on a total of 10 000 events recorded. **Section II-** Absolute numbers of normal (a and c) and larger (b and d) NK1.1⁺ cells (a and b) and B220⁺ lymphocytes (c and d) in bone marrow from mock-infected (■), L2-MHV3- (□) and YAC-MHV3- (▣) infected C57BL/6 mice at 24 hrs p.i. Myeloid lymphocytes were double labelled using anti-NK1.1-PE and anti-B220-FITC mAbs and were analysed using a FACScan flow cytometer on a total of 10 000 events recorded. The results are representative of three experiments. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

3.1.4.5- Cytotoxic properties of liver, spleen and bone marrow NK1.1⁺ cells from L2-MHV3- and YAC-MHV3-infected mice

To verify whether the cytotoxicity mediated by NK cells was also impaired in the liver, spleen or bone marrow of L2-MHV3-infected mice, lymphoid cells from these organs were collected from groups of three mice infected with L2-MHV3 or YAC-MHV3 and cytotoxicity against YAC-1 cells was assayed. As shown in Fig. 8, cytotoxic activity increased in the liver (p<0,001) but disappeared in the bone marrow (p<0,001) in L2-MHV3-infected mice. In YAC-MHV3-infected mice, a low decrease in NK cell cytotoxicity was also detected but only in the bone marrow (p<0,05). A non-significant increase of cytotoxic response was detected in liver from YAC-MHV3-infected mice. The absence of cytotoxic activity for splenic L2-MHV3-infected NK cells may be associated to a decrease of these cells in the spleen.

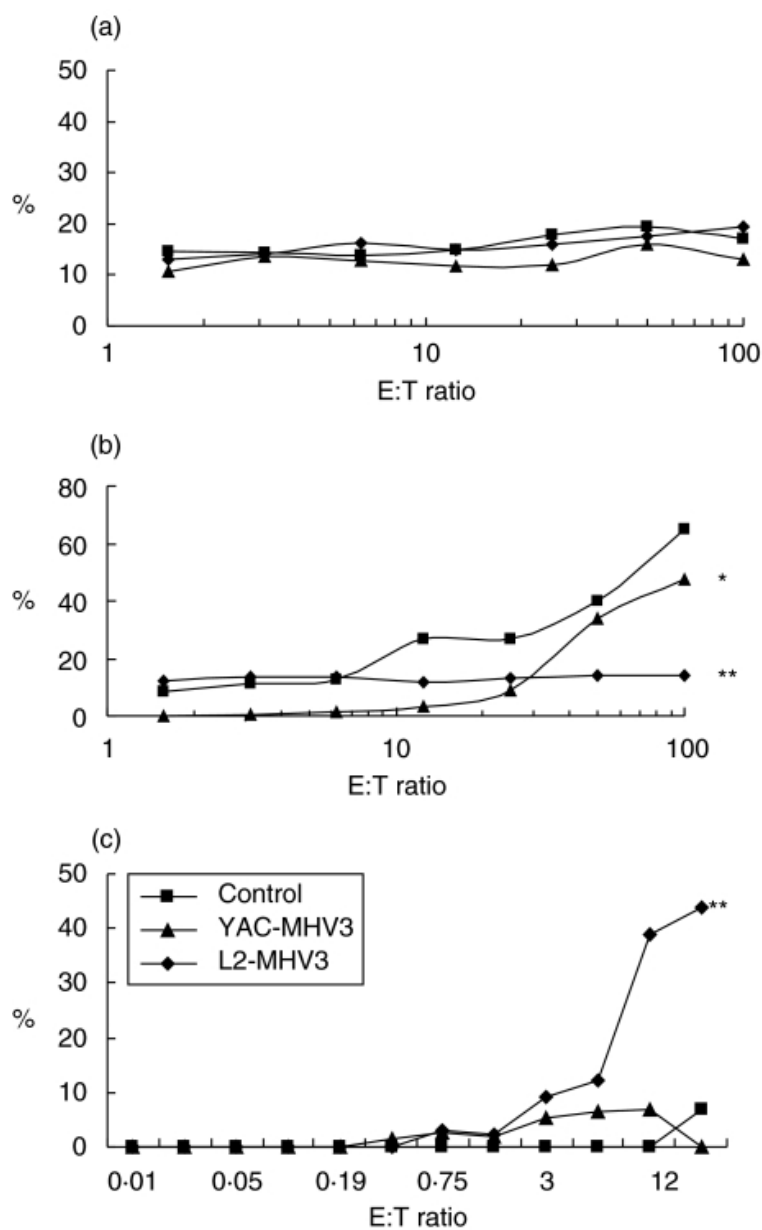


Figure 8. Determination of the percentage of cytotoxic activity of the splenic (a), myeloid (b) and intrahepatic (c) NK1.1⁺ cells from mock-infected (■), L2-MHV3 (◊) and YAC-MHV3 (▲) -infected C57BL/6 mice at 72 hrs p.i. Cytotoxicity of lymphoid cells from liver, spleen and bone marrow against YAC-1 target cells was evaluated by release of LDH activity in the supernatant. The optical density was recorded using an ELISA reader (490 nm filter). The experiments were conducted in triplicate. *p<0,05; **p<0,001.

3.1.4.6- *In vitro* infections of IL-15-stimulated bone marrow NK1.1⁺ cells with either the pathogenic L2-MHV3 or the attenuated YAC-MHV3 strain

To verify if the depletion of bone marrow NK1.1⁺ cells was related to the cell permissivity to viral replication, *in vitro* viral infections were performed on rmIL-15-stimulated bone marrow lymphoid cells. Bone marrow lymphoid cells were incubated with 20 ng/ml of rmIL-15, to increase the number of NK1.1⁺ cells, and then infected with 0,1-1 m.o.i. of L2-MHV3 or YAC-MHV3 viruses for 24 hrs. The rmIL-15 treatment increased the number of viable cells by $152 \pm 18\%$. However, L2-MHV3 and YAC-MHV3 infections reduced the number of rmIL-15-treated cells by $55 \pm 5\%$ and $33 \pm 0,3\%$, respectively ($p < 0,001-0,01$).

The cytofluorometric analysis of rmIL-15-stimulated myeloid cells revealed that the percentage of larger cells decreased in L2-MHV3-infected cells only ($p < 0,05$) (Fig. 9, section I). The phenotypic analysis of these cells, using PE-anti-NK1.1 and anti-FITC-B220 mAbs, indicated that the larger NK1.1⁺ cells increased in rmIL-15-treated myeloid cells when compared with the untreated cells ($p < 0,001$) (Fig. 9, section I). However, the percentages of larger NK1.1⁺ cells decreased when infected with L2-MHV3 or YAC-MHV3 viruses ($p < 0,001$) (Fig. 9). Normal B220⁺ lymphocytes only decreased in L2-MHV3-infected cells ($p < 0,05$) (results not shown). No significant alterations in the percentages of normal NK1.1⁺ cells were observed in L2-MHV3- or YAC-MHV3-infected cells.

Cytopathic effects (CPE) and infectious virus titres in the supernatants from both L2-MHV3- or YAC-MHV3-infected rIL-15-treated bone marrow lymphoid cells were then verified. Typical CPE of MHV viruses, characterized by cell rounding and syncytia formation, were detected in bone marrow lymphoid cells infected with L2-MHV3. However, less extensive CPE were detected in YAC-MHV3-infected cells. Viral titration revealed that infectious viruses were produced by bone marrow lymphoid cells infected *in vitro* with both L2-MHV3 ($4,6 \pm 0,28 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$) and YAC-MHV3 ($3,95 \pm 0,21 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$) viruses.

To verify whether the viral replication is involved in the induction of apoptosis, a TUNEL assay was performed on bone marrow rmIL-15-stimulated lymphoid cells. The results indicated that most of the rmIL-15-stimulated lymphoid cells became apoptotic when infected with L2-MHV3 ($86,6 \pm 1,7\%$, $p < 0,001$). However, the attenuated YAC-MHV3 induced a lower level of apoptosis ($49,9 \pm 3,1\%$, $p < 0,001$).

To confirm that the apoptotic NK cells resulted from viral infection, L2-MHV3- and YAC-MHV3-infected apoptotic NK cells were identified using a double labelling with TUNEL reagents and anti-NK (DX5) mAbs. Syncytia formed by fused NK⁺ cells contained apoptotic nuclei, as shown in Fig. 9 (section II), were found in both L2-MHV3- and YAC-MHV3-infected cells. However, larger syncytia were observed in L2-MHV3-infected cells than in YAC-MHV3-infected cells. Qualitative evaluation of TUNEL⁺NK⁺ syncytia revealed that a higher number of syncytia occurred in L2-MHV3 (4-5 syncytia by microscopic field)-infected cells than in YAC-MHV3 (1-3 syncytia by microscopic field).

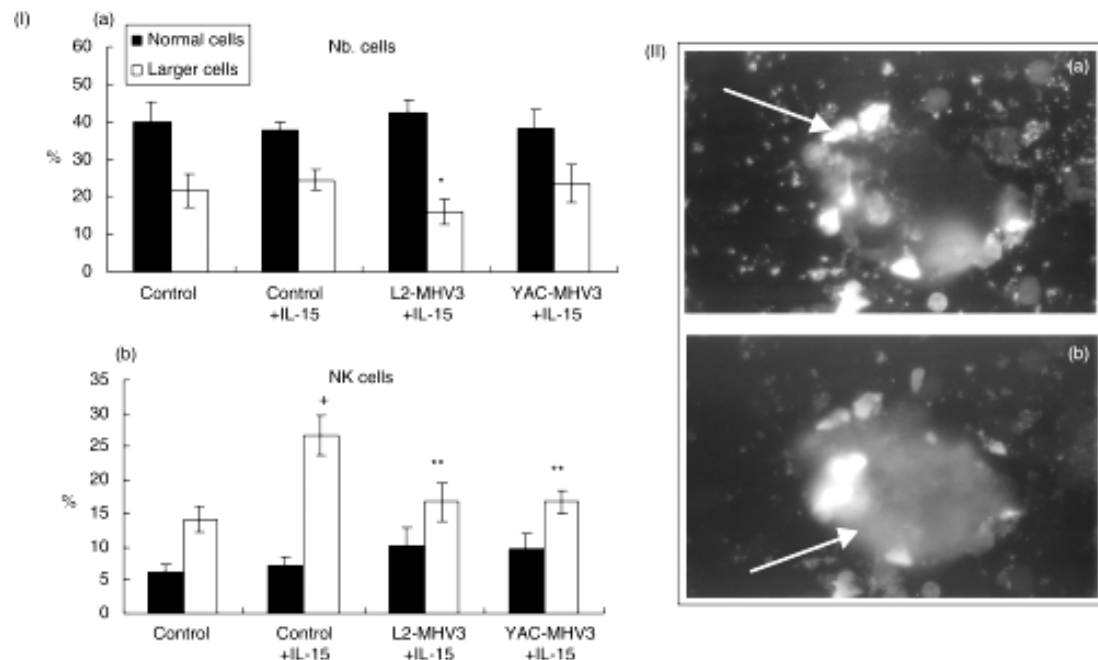


Figure 9. Section I- Percentages of total (a) and NK1.1⁺ (b) normal (■) and larger (□) cells in control, L2-MHV3- and YAC-MHV3-infected myeloid cells stimulated *in vitro* with IL-15 from C57BL/6 mice. Myeloid lymphocytes were incubated with 20 ng/ml of rmIL-15 for 7 days, then infected with 0,1-1 m.o.i. of L2-MHV3 or YAC-MHV3 for 24 hrs. Non-adherent cells were collected and immunolabelled with anti-NK1.1-PE and anti-B220-FITC mAbs. Lymphoid cells were gated according to FSC/SSC parameters obtained on a FACScan flow cytometer and the percentages of cells were evaluated based on a total of 10 000 events recorded. Results are representative of three experiments. +p<0,01 (compared with negative control); *p<0,05 and **p<0,01 (compared with control + IL-15). **Section II-** Syncytia of NK⁺TUNEL⁺ cells in L2-MHV3-infected IL-15-stimulated myeloid cells. TUNEL labelling (a) and FITC-DX5 antibody labelling (b).

3.1.4.7- *In vitro* infections of intrahepatic IL-15-stimulated NK1.1/αβ-TCR cell subsets with the pathogenic L2-MHV3 and the attenuated YAC-MHV3 viruses

To verify whether the recruited intrahepatic NK cells are also permissive to viral infection, intrahepatic lymphoid cells were isolated from uninfected C57BL/6 mice and infected *in vitro* with 0,1-1 m.o.i. of L2-MHV3 or YAC-MHV3 for 24 hrs. The cells were then double-labelled with PE-anti-NK1.1 and FITC-anti-αβ-TCR mAbs and the percentages of the NK1.1/αβ-TCR cell subsets were recorded. As shown in the Fig. 10, the percentages of NK1.1⁺αβ-TCR⁻ or NK1.1⁺αβ-TCR^{inter} cells decreased in the presence of the L2-MHV3 virus (p<0,05). However, NK1.1⁺αβ-TCR⁻ cells increased in the presence of YAC-MHV3 (p<0,01) and no significant differences were observed between the percentages of control, L2-MHV3- or YAC-MHV3-infected NK1.1⁻TCR^{inter} or NK1.1⁻TCR⁺ cells.

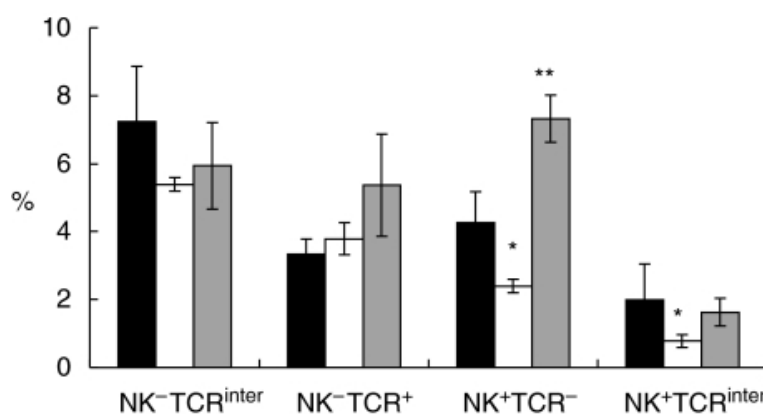


Figure 10. Percentages of NK1.1⁺TCR⁻, NK1.1⁺TCR^{inter}, NK1.1⁻TCR^{inter} and NK1.1⁻TCR^{high} cells in *in vitro* L2-MHV3- and YAC-MHV3-infected intrahepatic lymphoid cells stimulated with IL-15. Intrahepatic lymphocytes were incubated with 20 ng/ml of rIL-15 for 7 days, then infected with 0,1-1 m.o.i. mock-infected (■), L2-MHV3- (□) and YAC-MHV3- (▒) infected for 24 hrs and immunolabelled with anti-NK1.1⁺PE and anti- $\alpha\beta$ -TCR mAbs. Lymphoid cells were gated according to FSC/SSC parameters obtained on a FACScan flow cytometer and the percentages were evaluated based on a total of 10 000 events recorded. Results are representative of three experiments. *p<0,05; **p<0,01.

3.1.5- Discussion

In this work, we have demonstrated that pathogenic and attenuated MHV3 viruses induce NK cell death and apoptosis but lead to different levels of NK cell deletion in the bone marrow and their recruitment in the liver.

This is the first report indicating that NK1.1⁺ cells can be target cells of a coronavirus infection involving a decrease in innate immunity. We have also shown that, in mice infected with the pathogenic L2-MHV3 virus, cytotoxic NK cells were less recruited in the liver than other lymphoid cell subsets during the first days of infection. The decrease of splenic NK1.1⁺ cells observed in L2-MHV3-infected mice

indicates that the viral infection may favour either a recruitment of NK1.1⁺ cells to the liver, an *in situ* depletion of splenic NK1.1⁺ cells and/or an impairment of their production in the bone marrow due to virus-induced cell death.

The hypothesis of recruitment of splenic NK1.1⁺ cells in the livers of L2-MHV3-infected mice is supported by two observations: an increase in intrahepatic mononuclear cell numbers, including NK1.1⁺ cells, and a simultaneous decrease of splenic NK1.1⁺ cells. Recruitment of NK1.1⁺ cells in L2-MHV3-infected mice remained lower than that of other lymphoid cell subsets, indicating that the recruitment of NK1.1⁺ cells in the infected liver could explain partially the loss of splenic NK1.1⁺ cells in L2-MHV3-infected mice. These results are in agreement with previous studies demonstrating that, in contrast to other murine viral infections, only the first wave of recruited large granular cells, including NK1.1⁺ and CTL cells, occurs in the liver or peritoneal exudates of MHV-infected mice in the first 3 days p.i. (McIntyre et Welsh, 1986; Natuk et Welsh, 1987). The increase of absolute numbers in intrahepatic NK1.1⁺TCR⁻ cells in L2-MHV3-infected mice, however, remained low compared to the decrease in splenic NK1.1⁺ cells, suggesting either that most NK1.1⁺ cells are recruited in other target organs, that production of new NK1.1⁺ cells by the bone marrow is impaired or that these cells became apoptotic.

The fact that splenic NK1.1⁺ cells are normally mature and do not undergo mitosis (Williams *et al.*, 1997) suggests that their depletion may result of a decreased production in the bone marrow. This hypothesis was verified through the analysis of the NK1.1⁺ subpopulation in the bone marrow of L2-MHV3-infected mice. We have showed that both normal and larger lymphoid cells decreased in virus-infected mice. Normal NK1.1⁺ decreased as soon as 24 hrs p.i. while large B cells decreased later, indicating that myeloid NK1.1⁺ cells was more sensitive to virus-mediated depletion than B lineage cells. We hypothesis that the decrease in the numbers of NK1.1⁺ cells during the first 24 hrs p.i. is due to their recruitment to the liver. However, normal and larger NK1.1⁺ cells decreased strongly at 72 hrs p.i. only in the bone marrow from L2-MHV3-infected mice, suggesting a drop in their production rather than a low

recruitment to the liver. The *in vitro* L2-MHV3 infection of rIL-15 stimulated cells allowing to increase NK1.1⁺ cells rather than B cells (Puzanov *et al.*, 1997; Bykovskaia *et al.*, 1999), revealed that the depletion of NK1.1⁺ cells resulted from virus-induced cytopathic effects, viral replication and apoptosis occurring in syncytia, as demonstrated by the production of infectious particles and TUNEL assay. The permissivity of NK cells to L2-MHV3 infection involves the expression of the MHV receptor on the cell surface. CEACAM isoform 1 of the biliary glycoprotein (Bgp) molecules expressed on the cell surface are known to act as MHV receptor (Godfraind *et al.*, 1995b; Tan *et al.*, 2002). These molecules are present in many cell types, including hepatocytes, macrophages, endothelial cells, thymic epithelial cells and B lymphocytes (Godfraind *et al.*, 1995b; Godfraind et Coutelier, 1998). There are no reports concerning the expression of CEACAM1 on mouse NK1.1⁺ cells, but a similar protein was detected recently on human T cells and activated NK1.1⁺ cells (Moller *et al.*, 1996), suggesting that viral permissivity of NK1.1⁺ cells to MHV3 virus may be related to the presence of a specific MHV-receptor. Preliminary results from *in vitro* L2-MHV3 infections of NK1.1⁺ cells cultured in the presence of myeloid dendritic cells revealed that the NK1.1⁺ cells expressed intracellular viral proteins, thus reinforcing the hypothesis of viral replication in NK cells. In the present study, B220⁺ cells decreased slightly in L2-MHV3-infected myeloid cells, just as we had observed previously in infected myeloid B lineage cells (Jolicoeur et Lamontagne, 1989).

We can thus establish a relationship between the NK1.1⁺ cells and the pathogenic properties of the L2-MHV3 virus, as splenic NK1.1⁺ cells were less depleted in YAC-MHV3-infected mice than in L2-MHV3-infected mice. *In vitro* YAC-MHV3 infection of IL-15-stimulated myeloid cells also revealed higher cell viability and lower percentages of apoptotic cells when compared to L2-MHV3-infected cells. However, production of infectious particles was similar to that seen in L2-MHV3-infected cells. Despite a similar production of infectious viruses in the first 24 hrs p.i., the apparent discrepancy in the sensitivity of NK1.1⁺ cells to the attenuated YAC-MHV3 could be explained by the fact that a lower number of IL-15-stimulated myeloid cells can be efficiently infected by the YAC-MHV3 variant. We had already observed higher CPE

and increased cell death in L2-MHV3-infected macrophages compared to the YAC-MHV3 variant albeit comparable infectious virus titres during the first 24 hrs p.i. (Lamontagne *et al.*, 1989a).

The fact that the death of virus-infected NK1.1⁺ cells involves syncytia formation and apoptosis suggests that MHV3 replication induces an apoptotic process. It was demonstrated that MHV3 can induce apoptosis in macrophages from 8 hrs to 12 hrs p.i. (Belyavsky *et al.*, 1998a; Belyavsky *et al.*, 1998b). Interestingly, viral pathogenicity seems directly correlated with syncytia formation rather than apoptosis, as lower numbers of NK cell syncytia were observed in YAC-MHV3-infected cells even though *in vitro* apoptosis levels were similar to those induced by the pathogenic L2-MHV3 strain. The new E protein of MHV viruses has been related to the apoptotic process in virus-infected cells (An *et al.*, 1999).

Many previous studies have demonstrated that MHV3 is the most virulent serotype of the MHV viruses because it induces a fulminant hepatitis leading to the death of the animal within 3 days p.i. (Le Prevost *et al.*, 1975; Dupuy *et al.*, 1975). We have observed previously that splenic T and B cell subsets decreased in L2-MHV3-infected mice (Jolicoeur et Lamontagne, 1989; Lamontagne *et al.*, 1989b; Jolicoeur et Lamontagne, 1994). However, the fulminant hepatitis observed in C57BL/6 cannot be explained solely by T and B cell depletions. Budowski *et al.* (1983) have shown a higher replication of MHV and a more extensive hepatitis along with higher numbers of inflammatory foci in the livers of asialo-GM1-depleted mice, hinting at the important role of NK1.1⁺ cells in limiting the spread of the viral replication during the first days of the infection. Rather, Stohlman *et al.* (1983) have demonstrated that, in C57BL/6 mice, MHV-JHM induced an increase in natural cytotoxicity against YAC-1 target cells without detectable IFN- γ production, such as seen in lymphocytic choriomeningitis virus-infected mice. In addition, the NK1.1⁺ cell response was variable among mice, raising the possibility of MHV-mediated disorders in NK1.1⁺ functions. Our results are in agreement with these observations, but also suggest that higher cytotoxicity of intrahepatic NK cells from L2-MHV3-infected mice reflects extensive

histopathological lesions leading to a fulminant hepatitis and a rapid death rather than an efficient antiviral natural response.

The permissivity of NK1.1⁺ cells to viral infection and apoptosis is a new viral evasion mechanism which might favour viral replication in hepatocytes and other resident liver cells during the first days p.i. In addition, it is also probable that an impaired production of bone marrow NK1.1⁺ cells may not result solely from the viral permissivity of IL-15-stimulated cells but may also be related to a maturation defect resulting from viral replication in myeloid dendritic cells, as already observed in the thymus (Lamontagne et Jolicoeur, 1991).

The MHV3-infection is a powerful animal model for the study of the relationship between viral tropism for NK1.1⁺, T and B cells and the induction of the hepatitis process. Further work is in progress to identify bone marrow target cells involved in the NK1.1⁺ maturational defects as well as the implications of NK1.1⁺ permissivity in the hepatitis process.

3.1.6. Acknowledgements

This work was supported by a grant from NSERC-Canada. The authors thank Mr Christian Pagé and Christophe Dugré for their technical assistance as well as Dr Roland Savard and Mr Jean-Philippe Laverdure for revising this manuscript.

3.2- Article 2

L'objectif de cet article était de démontrer que l'hépatite aiguë induite chez la souris susceptible C57BL/6 par différents variants de pathogénicité du virus MHV3 était provoquée par une déficience au niveau de la réponse immunitaire innée, particulièrement les cellules NK et NK-T, de même qu'à une incapacité des cellules immunitaires compétentes à produire des cytokines immunosuppressives telles que IL-10, TGF- β et PGE₂. L'originalité de cet article a été l'utilisation de variants de pathogénicité du virus MHV3, possédant des tropismes divers et une réplication différente au niveau des cellules endothéliales sinusoidales et des cellules de Kupffer. Ces variants nous ont permis de mieux disséquer le rôle de ces cellules dans l'hépatite aiguë induite par le virus MHV3. Il a donc été possible de mettre en évidence l'implication des cellules de Kupffer dans le recrutement des cellules NK au niveau du foie des souris C57BL/6 infectées. Par ailleurs, l'intégrité des cellules de Kupffer et des LSEC serait également importante dans l'induction des cytokines immunosuppressives hépatiques IL-10, TGF- β et PGE₂ au cours de l'hépatite aiguë induite par le virus MHV3. De plus, cette étude a permis de démontrer pour la première fois que les cellules NK-T pouvaient être infectées par un coronavirus.

Mon rôle dans cet article a été d'effectuer toutes les expériences présentées dans cet article, de procéder à l'analyse de tous les résultats et de participer à la rédaction complète de l'article, en collaboration avec ma directrice de recherche.

INTRAHEPATIC ENDOTHELIAL AND KUPFFER CELLS INVOLVED IN
IMMUNOSUPPRESSIVE CYTOKINES AND NK/NK-T CELL DISORDERS IN THE
VIRAL ACUTE HEPATITIS

A. JACQUES, C. BLEAU, J.P. MARTIN & L. LAMONTAGNE

Département de microbiologie et d'immunologie

Université de Montréal, Canada

Publié dans la revue *Clinical and Experimental Immunology* (2008)

Volume 152, pp 298-310

3.2.1- Abstract

During acute viral hepatitis, the intrahepatic tolerance sustained by immunosuppressive cytokines such as interleukin (IL-4), IL-10, transforming growth factor (TGF)- β and prostaglandin E₂ (PGE₂), produced by Kupffer cells (KC), liver sinusoidal endothelial cells (LSEC), natural killer (NK)-T cells and natural regulatory T (T_{reg}) cells may be disturbed. NK cells are recruited normally in the liver and produce interferon (IFN)- γ to control viral replication. The use of mouse hepatitis virus type 3 (MHV3) attenuated variants showing selected tropisms for KC or LSEC have allowed determining their roles in the disturbances of immune tolerance during viral hepatitis. Groups of C57BL/6 mice were infected with the pathogenic L2-MHV3 (KC+, LSEC+), low attenuated 51.6-MHV3 (KC+, LSEC-), high attenuated CL12-MHV3 (KC-, LSEC-) or non-pathogenic YAC-MHV3 (KC+/-, LSEC-) variants for the first 3 days. Results showed that IL-10, TGF- β and PGE₂ production in liver decreased in L2-MHV3-infected mice and increased in 51.6-MHV3-, CL12-MHV3- and YAC-MHV3-infected mice. The ratio of IFN- γ /IL-4 in liver decreased in L2-MHV3-infected mice, while it was not (or low) altered in mice infected with the attenuated MHV3 variants mice. Phenotypic analysis of intrahepatic mononuclear cells revealed that apoptotic NK and NK-T cells increased in mice infected with the L2-MHV3, but were minor in 51.6-MHV3- and CL12-MHV3-infected mice. The numbers of CD4⁺ forkhead box P3⁺ cells increased in the livers from low pathogenic CL12-MHV3 and YAC-MHV3-infected mice. These results indicate that viral permissivity of KC and LSEC may be involved in the decrease of IL-10 and PGE₂, while KC may play an additional role in the apoptosis of NK and NK-T cells during acute viral hepatitis.

3.2.2- Introduction

Viral hepatitis is an inflammatory state induced by various viruses, mainly human hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV), and their elimination is under the control of the innate and the adaptive immune responses (Kimura *et al.*, 2002a). Integrity of the sinusoidal endothelial cells (LSEC), Kupffer cells (KC), natural

killer (NK)-T cells and natural regulatory T (T_{reg}) cells is essential to preserve the immune tolerance in the liver (Crispe, 2003; Wiegard *et al.*, 2005; Karrar *et al.*, 2007; You *et al.*, 2008). KC maintain the hepatic tolerance by producing interleukin (IL)-10 and prostaglandin E_2 (PGE_2), involved in the inhibition of recruited antigen-specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells to the liver by impairment of the surface expression of CD54, CD106, CD80 and CD86 expression in LSEC (Knolle *et al.*, 1998; Uhrig *et al.*, 2005). Furthermore, LSEC are known to produce tumour growth factor (TGF)- β , IL-10 and PGE_2 to promote liver regeneration and maintain immune tolerance (Bissell *et al.*, 1995; Knolle *et al.*, 1998). NK-T cells are involved in the control of hepatic immune tolerance through the production of IL-4 or interferon (IFN)- γ (Hammond *et al.*, 1999; Gansuud *et al.*, 2002). Finally, certain subpopulations of $CD4^+$ cells, called natural T_{reg} cells, generally expressing the $CD25^+$ forkhead box P3⁺ ($FoxP3^+$) phenotype are known to inhibit other cells (as T cells, macrophages, dendritic cells) through the production of immunosuppressive cytokines, such as IL-10 and/or TGF- β among others, which control inflammatory responses and hepatic damage in chronic HCV carriers (Jonuleit *et al.*, 2002; Bolacchi *et al.*, 2006).

The liver is an organ enriched in NK and NK-T cells. NK cells are involved in virus defence through their cytotoxic function and their capacity to secrete cytokines such as IFN- γ . NK-T cells are a peculiar subpopulation of cells expressing the NK1.1 marker and bearing a limited expression of T cell receptor (TCR)- $\alpha\beta$ or TCR- $\gamma\delta$ that recognize the CD1d molecule at the surface of the antigen presenting cells (MacDonald, 2002; Mallevaey *et al.*, 2007). Moreover, the function of NK-T cells may be CD1d-restricted or CD1d-unrestricted, and it has been suggested that CD1d-unrestricted NK-T cells are involved in the activation of the innate immune response, whereas CD1d-restricted NK-T cells promote adaptive immune response (Giroux et Denis, 2005). It has been shown that NK and NK-T cells are important to control the replication of HBV and HCV in liver through their secretion of IFN- γ (Seki *et al.*, 1998; Guidotti et Chisari, 2001; Kimura *et al.*, 2002b; Roland *et al.*, 2006). However, various studies have rather suggested a detrimental role of NK and NK-T cells during HBV and HCV infections, or

in concanavalin A (Con A)- and α -galactosideceramide (α GalCer)-induced hepatitis (Exley *et al.*, 2002; Ajuebor *et al.*, 2005; Biburger et Tiegs, 2005; Paladino *et al.*, 2007).

T_{reg} cells may decrease the activation and functions of NK cells, such as cytokine productions and cytotoxic activity, during a disease through the production of TGF- β (Simon *et al.*, 2007; Ralainirina *et al.*, 2007). Inversely, activated NK cells may interfere with CD28-mediated FoxP3 expression in $CD4^+CD25^-$ T cells. This phenomenon should be attributed to a molecular interaction between IFN- γ and the downstream signal of CD28 leading to a FoxP3 expression (Brillard *et al.*, 2007).

As the immune tolerance mechanism in the liver depends greatly upon the integrity of various populations of hepatic cells, it is difficult to study the functional relationships between LSEC, KC, T_{reg} , NK and NK-T cells in the breakdown of tolerance during viral hepatitis. The use of a natural mouse hepatitis model, the hepatitis virus type 3 (MHV3) and its variants possessing different cell tropisms and inducing different levels of hepatitis, may be helpful to unravel the roles for these cells in the aetiology of disease. The pathogenic L2-MHV3 strain induces acute hepatitis in C57BL/6 mice, and death of the animal occurs within 3-4 days (Le Prevost *et al.*, 1975). KC, LSEC and hepatocytes are permissive to the pathogenic L2-MHV3 virus and acute hepatitis is related to an extensive necrosis in the liver and to immunodeficiency in several lymphoid organs (Le Prevost *et al.*, 1975; Dupuy *et al.*, 1975; Martin *et al.*, 1994). The 51.6-MHV3 variant is less virulent than L2-MHV3, killing mice within 5-9 days, inducing a moderate liver necrosis, and infecting KC cells, but not LSEC (Martin *et al.*, 1994). The highly attenuated CL12-MHV3 variant induces the death of mice within 8-10 days, minor hepatitis with perivascular inflammatory foci, no immunodeficiency and undetectable infectious virions in LSEC or KC (Martin *et al.*, 1994). However, viral replication in liver was similar for pathogenic parental virus and attenuated variants (Lamontagne *et al.*, 1994), suggesting that the gravity of hepatitis may depend on the intensity of the inflammatory response. Finally, a non-pathogenic YAC-MHV3 variant, isolated from a persistent viral infection in YAC-1 cells, induces a

subclinical hepatitis characterized by few perivascular local inflammatory foci, and a subsequent recovery occurring within less than 15 days (Lamontagne et Dupuy, 1984).

We have demonstrated previously that L2-MHV3-induced acute hepatitis is related to the impairment of innate immunity as the numbers of splenic, myeloid and intrahepatic NK and NK-T cells decrease (Lehoux *et al.*, 2004). In addition, Stohlman *et al.* (1983) have demonstrated that splenic NK cells from MHV-A59-infected Balb/c mice are unable to produce IFN- γ although still exerting their cytotoxic activities.

We suggest that the viral permissivity of KC and/or LSEC to pathogenic L2-MHV3 results in the breakdown of liver immune tolerance sustained through a decrease in the production of anti-inflammatory cytokines by these cells. In addition, an imbalance of intrahepatic NK, NK-T and T_{reg} cells may thus favour the generation of fulminant acute hepatitis, in decreasing immunosuppressive cytokines.

In this study, we report that levels of intrahepatic IL-10, TGF- β , PGE₂ and the IFN- γ /IL-4 ratio decreased in the livers of pathogenic L2-MHV3-infected mice, but increased gradually in liver from mice infected with the attenuated variants. The viral permissivity of both KC and LSEC is involved in a marked down-regulation of immunosuppressive cytokines. In addition, KC play a role in NK/NK-T disorders during acute viral hepatitis.

3.2.3- Materials and methods

3.2.3.1- Mice

C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories (St-Constant, Québec, Canada) and were housed under HEPA-filtered air (Forma Scientific, Marietta, OH, USA). Female mice between 8 and 12 weeks of age were used in all experiments. The study was conducted in compliance with regulations from the Animal Committee of the Université du Québec à Montréal (UQAM).

3.2.3.2- Viruses

L2-MHV3 is a cloned pathogenic substrain isolated from the liver of infected DBA2 mice and maintained in L2 cells, as previously described (Dupuy et Rodrigue, 1981). Escape mutants 51.6-MHV3 and CL12-MHV3 were selected from the pathogenic L2-MHV3 virus in the presence of S protein-specific A51 and A37 monoclonal antibodies respectively (Martin *et al.*, 1994). The non-pathogenic YAC-MHV3 variant is a cloned substrain produced in persistently-infected YAC-1 cells (Lamontagne et Dupuy, 1984). Pathogenic and target cell properties are summarized in Table IV. All viruses were produced in L2 cells and their pathogenic properties were assessed regularly.

Table IV. Characterization of pathogenic properties and cell tropisms of MHV3 variants

| | L2-MHV3 | 51.6-MHV3 | CL12-MHV3 | YAC-MHV3 |
|------------------------------|--|---|---|---|
| Mortality (days p.i.) | ≈ 3 - 4 | ≈ 5 - 9 | ≈ 8 - 10 | Viral elimination |
| Histopathology | Acute fulminating hepatitis with extensive necrosis | Acute hepatitis with intrahepatic necrosis | Weak hepatitis with perivascular inflammatory foci | Subclinical hepatitis with local inflammatory foci |
| Immunodeficiency | Yes | Yes | No | No |
| Infection of LSEC | Yes | No | No | No |
| Infection of KC | Yes | Yes | No | Low replication |

LSEC: liver sinusoidal endothelial cells; KC: Kupffer cells; p.i.: post-infection; MHV3: mouse hepatitis virus type 3

3.2.3.3- In vivo viral infection

Groups of three mice were infected intraperitoneally (i.p.) with 1000 tissue culture infective dose 50% (TCID₅₀) of L2-MHV3, 51.6-MHV3, CL12-MHV3 or YAC-MHV3 viruses. Mock-infected mice received a similar volume of RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA). At various times post-infection (p.i.), the mice were anaesthetised by i.p. injection using ketamine hydrochloride (200 mg/kg) (Vetrepharm Canada Inc., Belleville, Ont, Canada) and xylazine (10 mg/kg) (Bayer Inc., Toronto, Ont, Canada). Mice were bled by section of the portal vein and aorta, as described by Watanabe *et al.* (1992). The livers were harvested following exsanguination.

3.2.3.4- Cells

The continuous mouse fibroblast L2 cell line was grown in RPMI-1640 supplemented with glutamine (2 mM), antibiotics (penicillin 100 U/ml and streptomycin 100 mg/ml) (Gibco Laboratories) and 5% fetal calf serum (FCS) (Gemini Bio-Products, Woodland, CA, USA). L2 cells were used for virus production.

Intrahepatic mononuclear cells (MNCs) were isolated from the liver of three mice in each experimental group as previously described (Lamontagne *et al.*, 1997). Briefly, the liver was pressed through a 70 µm cell strainer (Falcon Scientific Co., Montréal, Québec, Canada) which was then washed with 10 ml of supplemented RPMI-1640 and 20% FCS. The cell suspension was then layered on 7 ml of FCS to allow debris sedimentation. The top layer was centrifuged 10 min at 1000g and the supernatant was collected for quantification of cytokines. The cells were then resuspended and centrifuged on top of a discontinuous Percoll gradient (45% and 67% Percoll) (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) for 30 min at 1000g. MNCs were collected at the interface of the 45% and 67% Percoll layers. The cells were then washed and resuspended in phosphate buffer saline (PBS) (Gibco Laboratories). Cell viabilities, ranging from 90 to 100%, were assayed by a trypan blue exclusion test.

3.2.3.5- *In vitro* viral infection

Intrahepatic MNCs were isolated from the livers of uninfected mice and were seeded in 24-well plates at a concentration of 10^6 cells/ml in supplemented RPMI-1640 and 20% FCS. The cells were infected with 0,1 to 1,0 multiplicity of infection (m.o.i.) of L2-MHV3, 51.6-MHV3, CL12-MHV3 or YAC-MHV3 viruses and were then incubated further at 37°C, under 5% CO₂, for 48 hrs.

3.2.3.6- Flow cytometric analysis

The percents of intrahepatic NK1.1⁺TCR- $\alpha\beta$ ⁻, NK1.1⁻TCR- $\alpha\beta$ ⁺, NK1.1⁺TCR- $\alpha\beta$ ⁺, CD4⁺FoxP3⁻ and CD4⁺FoxP3⁺ T cells from mock- or different virus-infected mice were determined by double immunolabellings. Firstly, intrahepatic MNCs were isolated, then 10^6 cells were resuspended in PBS and CD16/CD32 receptors were blocked (Pharmlingen, Toronto, Ont, Canada) for 15 minutes. The cells were then incubated on ice for 30 min with 1 μ g of anti-mouse fluorescein isothiocyanate (FITC)-NK1.1 (clone PK136, mouse IgG2a κ , Pharmlingen), 1 μ g of anti-mouse phycoerythrin (PE)-TCR- β (clone H57-597, Armenian Hamster IgG2 λ 1, Pharmlingen) or 1 μ g of anti-mouse PE-CD4 (clone RM4-5, rat IgG2a κ , Pharmlingen). Depending upon the experiment, thereafter the cells were fixed and permeabilized (eBioscience, San Diego, CA, USA) and labelled with 1 μ g of anti-mouse/rat FITC-FoxP3 (clone FJK-16s, rat IgG2a κ , eBioscience). Flow cytometric analysis was performed on a fluorescence-activated cell flow cytometer (FACScan) (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA) and with Cell Quest software (Becton-Dickinson). Ten thousand cells were analyzed per sample.

3.2.3.7- TdT-mediated biotin-dUTP nick-end labelling (TUNEL) assay

Intrahepatic MNCs were purified from mock-infected and L2-MHV3-infected C57BL/6 mice and adjusted to a concentration of 10^6 cells/ml. The cells were

stained with the FITC-TUNEL reagent (Roche Diagnostics, Laval, Qc, Canada) for 60 min at 37°C in a humidified atmosphere. Flow cytometric analysis was performed on a FACScan and with the Cell Quest software as indicated above.

3.2.3.8- Determination of intracytoplasmic viral proteins

Permissivity of intrahepatic NK and NK-T cells to viral infection was assessed by double immunolabellings. *In vitro* infected intrahepatic MNCs were collected, 10^6 cells were resuspended in PBS and CD16/CD32 receptors were blocked during 15 min. The cells were then incubated on ice for 30 min with 1 µg of anti-mouse CD1d:Ig (Recombinant Fusion Protein, Mouse DimerX, Pharmingen)/PE-IgG₁ (anti-mouse IgG₁, Clone A85-1, Pharmingen) or 1 µg of anti-mouse PE-DX5 (clone DX5, Rat IgMκ, Pharmingen). Once washed, the cells were incubated thereafter on ice 30 min with optimal dilutions of anti-mouse MHV3 (polyclonal antisera)/FITC-IgG (anti-mouse IgG, γ-chain specific, Sigma-Aldrich, Oakville, Ont, Canada). Flow cytometric analysis was performed on a FACScan with the Cell Quest software as indicated above.

3.2.3.9- Cytokine determinations by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Cytokines produced in the liver of mock- and MHV3-infected mice were quantified using IFN-γ, IL-4, IL-10, TGF-β (Pharmingen) and PGE₂ (Biosource International, Camarillo, CA, USA) commercial mouse ELISA tests. Results were **reproducible in all the groups of treated-mice.**

3.2.3.10- Statistical analysis

Comparison between cytokine levels and percentages of cell subsets of infected and control mice were performed using a two-way analysis of variance (ANOVA) test. All statistical comparisons were calculated with the GraphPad Prism version 4.03

software. Error bars represent standard error and a value of $p < 0,05$ was considered significant.

3.2.4- Results

3.2.4.1- Pathology induced by the pathogenicity variants of MHV3 in susceptible C57BL/6 mice

In order to verify the level of hepatitis induced by the different virus variants, groups of three C57BL/6 mice were infected with 1000 TCID₅₀ of pathogenic L2-MHV3 (LSEC+, KC+), low attenuated 51.6-MHV3 (LSEC-, KC+), highly attenuated CL12-MHV3 (LSEC-, KC-) or non-pathogenic YAC-MHV3 (LSEC-, KC+) viruses. The mice were euthanized at 24 hrs, 48 hrs and 72 hrs p.i. and their liver were collected. Macroscopic observations of organs revealed that livers from mice infected with the pathogenic L2-MHV3 virus were friable, pale, with rounded extremities. These features were moderate in livers from 51.6-MHV3-infected mice and were considerably milder in livers from CL12-MHV3-infected mice. The livers from YAC-MHV3-infected mice exhibited normal colour and texture. Macroscopic observations were consistent with previous pathological features of the liver from mice infected with these variants, as reported previously (Le Prevost *et al.*, 1975; Martin *et al.*, 1994; Lamontagne *et al.*, 1994).

3.2.4.2- Impairment of intrahepatic immunosuppressive cytokines production during an acute viral hepatitis induced by the pathogenic L2-MHV3, low attenuated 51.6-MHV3, highly attenuated CL12-MHV3 and non-pathogenic YAC-MHV3 viruses

Differences in the level of hepatitis in accordance with the KC and LSEC tropism variants suggest that immunosuppressive cytokines produced by these cells may be altered during the acute hepatitis. Groups of three C57BL/6 mice were infected with 1000 TCID₅₀ of pathogenic L2-MHV3, low attenuated 51.6-MHV3, highly attenuated CL12-MHV3 or non-pathogenic YAC-MHV3 viruses. The livers were collected at

various times p.i., and the levels of IL-10, TGF- β and PGE₂ were determined by ELISA tests in the supernatants from liver extracts, since these three cytokines were known to be involved in the hepatic tolerance.

When compared to livers from mock-infected mice, intrahepatic production of IL-10 was lower in mice infected with the pathogenic L2-MHV3 virus from 48 hrs ($p<0,05$) to 72 hrs p.i. ($p<0,01$), whereas it was higher in mice infected with the non-pathogenic YAC-MHV3 variant from 24 hrs to 72 hrs p.i. ($p<0,01$ at 24 hrs p.i.; $p<0,05$ at 48 hrs and 72 hrs p.i.) (Fig. 11A). Furthermore, IL-10 was produced in the livers from highly attenuated CL12-MHV3-infected mice at 72 hrs p.i. ($p<0,01$), whereas it increased slightly at 48 hrs p.i. only in mice infected with the low attenuated 51.6-MHV3 ($p<0,05$) (Fig. 11A).

Intrahepatic TGF- β levels were not modified in C57BL/6 mice infected with the pathogenic L2-MHV3 virus, whereas they increased in liver from all attenuated MHV3 variants at 72 hrs p.i. ($p<0,05$). A slight increase in TGF- β was also observed at 48 hrs p.i. in 51.6-MHV3-infected mice ($p<0,05$) (Fig. 11B).

Intrahepatic PGE₂ increased in all infected mice at 24 hrs p.i. ($p<0,05$ for L2-MHV3, 51.6-MHV3 and CL12-MHV3; $p<0,01$ for YAC-MHV3) (Fig. 11C), and dropped at 48 hrs p.i. in all mice except for the group of mice infected with the YAC-MHV3 variant ($p<0,001$). Intrahepatic PGE₂ increased in all attenuated MHV3-infected mice at 72 hrs p.i. ($p<0,05$ for 51.6-MHV3; $p<0,001$ for CL12-MHV3; $p<0,01$ for YAC-MHV3) (Fig. 11C).

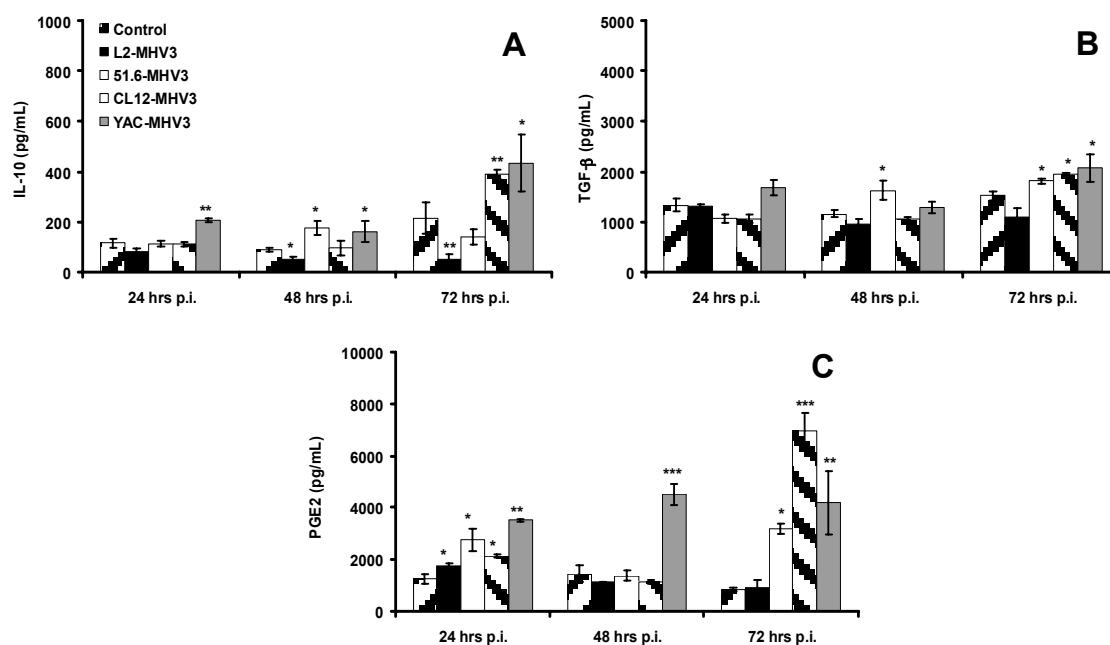


Figure 11. Production of intrahepatic interleukin (IL)-10 (A), transforming growth factor (TGF)- β (B) and prostaglandin E₂ (PGE₂) (C) in mock-, L2-mouse hepatitis virus type 3 (MHV3)-, 51.6-MHV3-, CL12-MHV3- and YAC-MHV3-infected C57BL/6 mice at various times post-infection. Three mice were used in each experimental group and the levels of cytokines in MHV3-infected mice at different times p.i. were compared to their respective controls. The results were representative of previous studies. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

3.2.4.3- Intrahepatic IFN- γ /IL-4 ratio reflects the pathogenicity of the different MHV3 variants

The decrease in immunosuppressive cytokines is in inverse relationship with the pathogenicity of MHV3 variants, suggesting an imbalance between the levels of pro-inflammatory IFN- γ and the suppressive IL-4 cytokine in the liver. In order to verify this hypothesis, groups of three C57BL/6 mice were infected with 1000 TCID₅₀ of pathogenic L2-MHV3, low attenuated 51.6-MHV3, highly attenuated CL12-MHV3 or

non-pathogenic YAC-MHV3 viruses. The livers were collected at various times p.i. and the intrahepatic IFN- γ and IL-4 productions were determined by ELISA tests in supernatants from liver extracts.

IFN- γ levels decreased in the livers from all MHV3-infected C57BL/6 mice as early as 24 hrs p.i. ($p < 0,05$ for L2-MHV3, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3; $p < 0,01$ for CL12-MHV3) (Fig. 12, section I-A). Thereafter, IFN- γ levels decreased further in the liver of all MHV3-infected mice except for the YAC-MHV3-infected mice ($p < 0,001$ for L2-MHV3; $p < 0,05$ for 51.6-MHV3; $p < 0,01$ for CL12-MHV3). At 72 hrs p.i., IFN- γ was impaired only in L2-MHV3-infected mice ($p < 0,001$), whereas the levels increased slightly for all attenuated MHV3 variants ($p < 0,05$).

Similarly, IL-4 decreased rapidly in the livers from L2-MHV3-, 51.6-MHV3- and CL12-MHV3-infected mice as early as 24 hrs p.i. ($p < 0,01$ for L2-MHV3; $p < 0,05$ for 51.6-MHV3 and CL12-MHV3) (Fig. 12, section I-B), and remained lower at 72 hrs only in L2-MHV3-infected mice ($p < 0,05$). However, intrahepatic IL-4 increased in 51.6-MHV3-infected mice up to 48-72 hrs p.i. ($p < 0,01$ for both times), while only a slight increase was noted with the CL12-MHV3 variant at 72 hrs p.i. ($p < 0,05$). No changes were observed in YAC-MHV3-infected mice.

The IFN- γ /IL-4 ratio, as defined by the difference between the ratio of these cytokines in liver from infected mice compared to those from mock-infected mice, was calculated for each mouse infected with the different virus variants. Consequently, the ratio for mock-infected mice has been fixed to a value of '1' and the ratios from infected mice were compared to the ratio in mock-infected mice. Results shown in Figure 12 (section II) reveal that the intrahepatic IFN- γ /IL-4 ratio for the L2-MHV3 virus increased only at 24 hrs p.i. ($p < 0,05$), decreasing thereafter until 72 hrs p.i. ($p < 0,05$ at 48 hrs p.i.; $p < 0,001$ at 72 hrs p.i.). No variation of the intrahepatic IFN- γ /IL-4 was measured in mice infected with the attenuated MHV3 variants, except for the CL12-MHV3 virus at 24 hrs p.i. ($p < 0,05$) and the YAC-MHV3 virus at 24 hrs ($p < 0,01$) and 48 hrs p.i. ($p < 0,05$), which were lower than mock-infected mice. Nevertheless, the

intrahepatic IFN- γ /IL-4 ratio increased with time in CL12-MHV3- and in YAC-MHV3-infected mice.

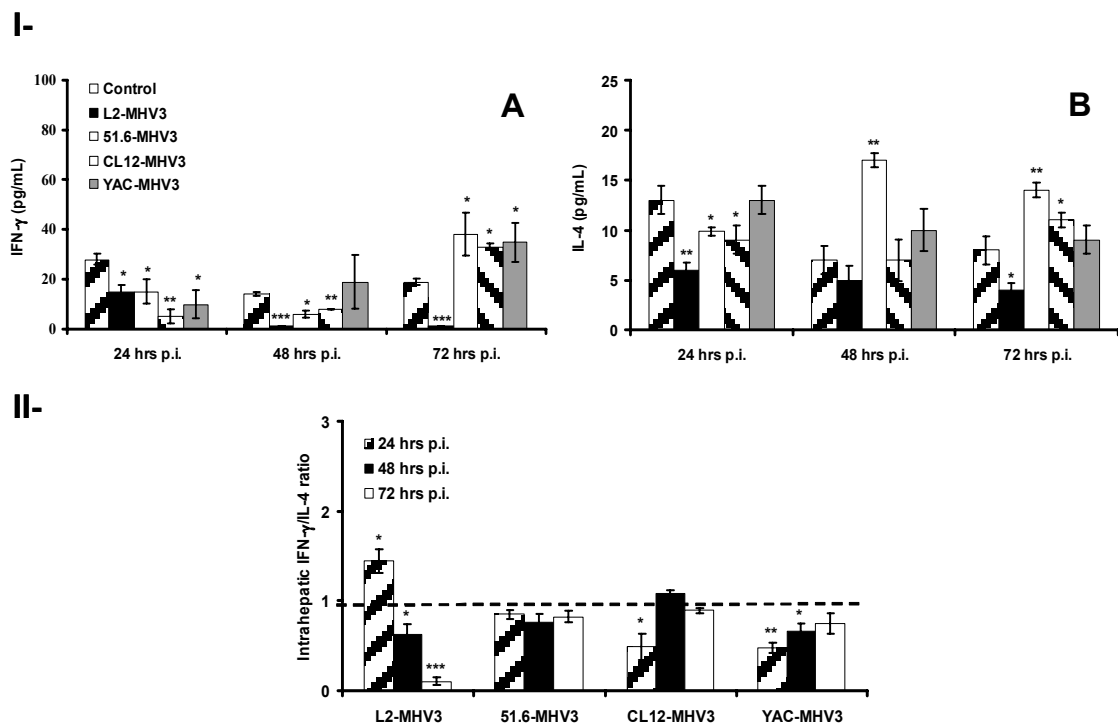


Figure 12. Section I- Production of intrahepatic interferon (IFN)- γ (A) and interleukin (IL)-4 (B) in mock-, L2-mouse hepatitis virus type 3 (MHV3)-, 51.6-MHV3-, CL12-MHV3- and YAC-MHV3-infected C57BL/6 mice at various times post-infection (p.i). **Section II-** Intrahepatic IFN- γ /IL-4 ratios in L2-MHV3-, 51.6-MHV3-, CL12-MHV3- and YAC-MHV3-infected C57BL/6 mice at various times p.i. Three mice were used in each experimental group. The results were representative of previous studies. Intrahepatic IFN- γ /IL-4 ratios in virally-infected mice were compared to those from their respective mock-infected mice, which were considered as a value of “1”. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

3.2.4.4- The CD4⁺FoxP3⁺ cell population is not involved in the production of intrahepatic immunosuppressive cytokines in attenuated MHV3-infected mice

The increases of the IL-10 and TGF- β levels observed at 72 hrs p.i. in the livers from mice infected with the attenuated MHV3-infected C57BL/6 mice but not with the pathogenic L2-MHV3 parental virus may be resulting from the activation of T_{reg} cells, known to secrete these cytokines (Jonuleit *et al.*, 2002; Erhardt *et al.*, 2007; Vignali *et al.*, 2008). To verify this hypothesis, groups of three C57BL/6 mice were infected with 1000 TCID₅₀ of pathogenic L2-MHV3, low attenuated 51.6-MHV3, highly attenuated CL12-MHV3 or non-pathogenic YAC-MHV3 viruses. The livers were collected at 72 hrs p.i., and intrahepatic MNCs were phenotyped using anti-FoxP3 and anti-CD4 antibodies. The numbers of CD4⁺FoxP3⁺ cells increased in the livers from CL12-MHV3 and YAC-MHV3-infected mice ($p < 0,05$) (Fig. 13A). However, the population of CD4⁺FoxP3⁻ cells decreased in L2-MHV3 and 51.6-MHV3-infected mice, whereas they increased in CL12-MHV3 and YAC-MHV3-infected mice ($p < 0,05$) (Fig. 13B). In consequence, the relative level of hepatic T_{regs} increased slightly in L2-MHV3-infected mice ($p < 0,05$), while they were not altered significantly in mice infected with the attenuated MHV3 variants (Fig. 13C).

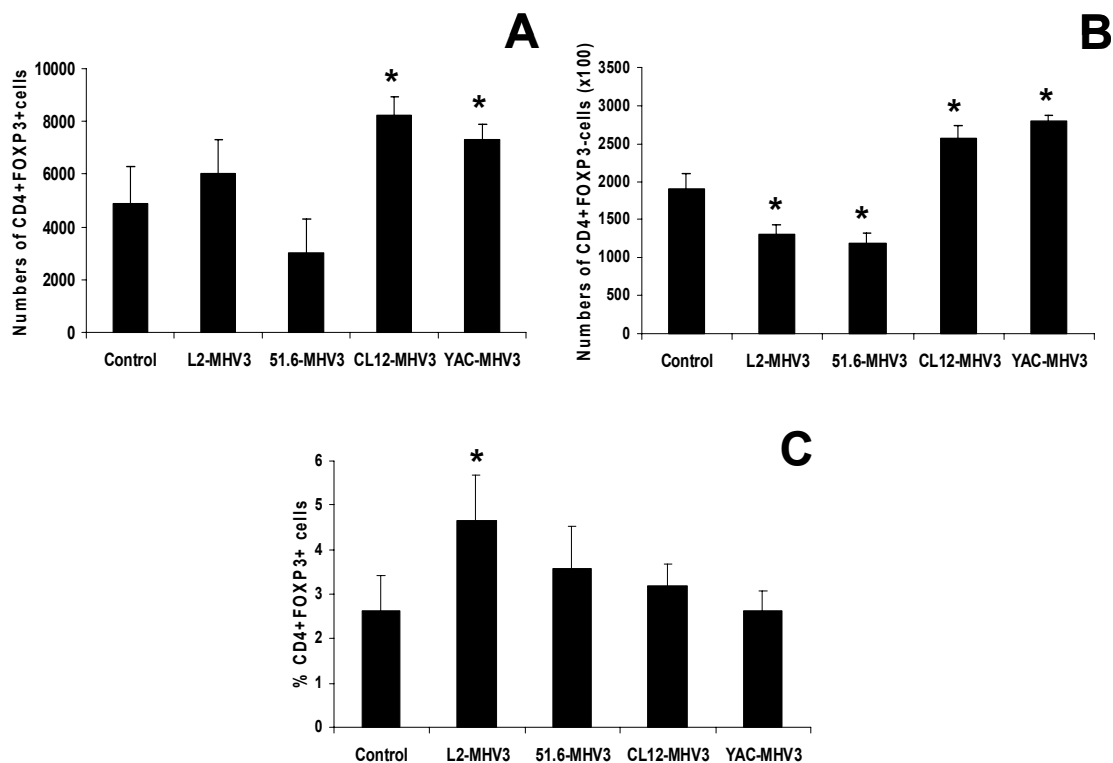


Figure 13. Absolute numbers of CD4⁺ FoxP3⁺ (A) and CD4⁺FoxP3⁻ (B) cells, and percentages of CD4⁺FoxP3⁺ cells within the intrahepatic CD4⁺ cell population (C) from mock-, L2-mouse hepatitis virus type 3 (MHV3)-, 51.6-MHV3-, CL12-MHV3- and YAC-MHV3-infected C57BL/6 mice at 72 hrs post-infection. Three mice were used in each experimental group. The results were representative of previous studies. The cells were analyzed using a fluorescence activated cell sorter (FACScan) flow cytometer. A total of 10 000 events were recorded. The cell numbers of each subset were calculated on the basis of 10⁶ isolated intrahepatic mononuclear cells. (*p<0,05)

3.2.4.5- Intrahepatic NK1.1⁺βTCR⁻, NK1.1⁺βTCR⁺ and NK1.1⁻βTCR⁺ cells in livers from mice infected with the pathogenic MHV3 variants

Pro-inflammatory IFN-γ and suppressive IL-4 are produced normally in the liver by intrahepatic NK and NK-T cells (Hammond *et al.*, 1999; Mallevaey *et al.*, 2007).

The strong decrease of IFN- γ and IL-4 in liver measured in L2-MHV3-infected mice and the transient decrease of these cytokines in the liver from attenuated MHV3-infected mice suggests a decrease in IFN- γ -producing NK or IL-4/IFN- γ -producing NK-T cells. We have also observed previously that the numbers of intrahepatic NK cells, but not NK-T cells, decreased in L2-MHV3-infected mice due to apoptosis (Lehoux *et al.*, 2004).

Firstly, groups of three mice were infected with 1000 TCID₅₀ of pathogenic L2-MHV3, low attenuated 51.6-MHV3, highly attenuated CL12-MHV3 or non-pathogenic YAC-MHV3 viruses and the livers were collected at different times p.i. Intrahepatic MNCs were isolated and were labelled subsequently with the TUNEL reagent in order to localize the normal and apoptotic MNCs by a cytofluorometric analysis. As shown in Figure 14 (section I-A), two distinct cell populations were observed according to FSC/SSC parameters: the G1 region was characterized by cells expressing high FSC and low SSC parameters, and the G2 region contained cells with low FSC and higher SSC profiles. TUNEL labelling revealed that a small percentage of G1 cells were TUNEL⁺ ($10,0 \pm 2,4\%$), whereas the majority of G2 cell population were TUNEL⁺ ($97,0 \pm 3,0\%$). The percentages of total MNCs within the G1 region decreased in L2-MHV3-infected mice and increased in the G2 region (Fig. 14, section I-A). However, no differences in the percentages of TUNEL⁺ cells in G1 and G2 cell groups were observed in intrahepatic MNCs isolated from mock-infected or from L2-MHV3-infected mouse. Results presented in this figure refer to one mock-infected and one L2-MHV3-infected mouse and are representative of all mice from each group. The apoptosis of cells within the G2 region observed by the TUNEL test was also confirmed by Annexin V/propidium iodide labelling (data not shown).

Secondly, to identify the phenotype of normal and apoptotic intrahepatic cells, intrahepatic MNCs were then double labelled with anti-NK1.1 and anti-TCR- β antibodies. The multiparametric analysis of NK1.1⁺TCR- β ⁻, NK1.1⁺TCR- β ⁺ and NK1.1⁻TCR- β ⁺ cells in livers from infected mice was then conducted with cells within the G1 or G2 regions. Results presented in Figure 14 (section II-A), indicate that intrahepatic

NK1.1⁺TCR- β ⁻ cells from normal cells (G1 region) increased in livers from pathogenic L2-MHV3-infected mice at 48 hrs p.i. ($p < 0,01$) and in low attenuated 51.6-MHV3-infected mice from 48 hrs to 72 hrs p.i. ($p < 0,05$ for both times). No significant variations in this cell population were observed in livers from highly attenuated CL12-MHV3-infected mice, whereas they decreased slightly at 24 hrs p.i. in non-pathogenic YAC-MHV3-infected mice ($p < 0,05$).

Percentages of intrahepatic NK-T cells (NK1.1⁺TCR- β ⁺) in normal cells (G1 region) decreased in all MHV3-infected mice at 24 hrs p.i. ($p < 0,05$ for all MHV3 viruses) (Fig. 14, section II-B). These cells increased transiently at 48 hrs p.i. in pathogenic L2-MHV3-infected mice ($p < 0,05$) and at 72 hrs p.i. in low attenuated 51.6-MHV3-infected mice ($p < 0,01$).

In addition, NK1.1⁻TCR- β ⁺ cells increased from 48 hrs to 72 hrs p.i. in the livers from L2-MHV3- ($p < 0,001$ for both times) and YAC-MHV3-infected mice ($p < 0,05$ at 48 hrs p.i.; $p < 0,01$ at 72 hrs p.i.) compared to mock-infected mice (Fig. 14, section II-C). An increase in this cell population was noted only with the 51.6-MHV3 variant at 72 hrs p.i. ($p < 0,01$), whereas it decreased at 24 hrs p.i. with the CL12-MHV3 virus ($p < 0,05$).

However, apoptotic intrahepatic NK1.1⁺TCR- β ⁻ cells (G2 region) increased strongly from 48 hrs to 72 hrs p.i. in L2-MHV3- ($p < 0,001$ for 48 hrs p.i.; $p < 0,01$ for 72 hrs p.i.) and 51.6-MHV3-infected mice ($p < 0,01$ for 48 hrs p.i.; $p < 0,05$ for 72 hrs p.i.) (Fig. 14, section II-D). No significant variations were observed in cells from mice infected with the CL12-MHV3 variant, characterized by a transient decrease only at 24 hrs p.i. in YAC-MHV3-infected mice ($p < 0,05$).

The percentages of apoptotic NK1.1⁺TCR- β ⁺ (NK-T) cells increased in the livers from L2-MHV3- and 51.6-MHV3-infected mice at 72 hrs p.i. only ($p < 0,05$) (Fig. 14, section II-E). However, they decreased in livers from all attenuated MHV3-infected mice from 24 hrs ($p < 0,05$ for all attenuated MHV3 variants) to 48 hrs p.i. ($p < 0,001$ for 51.6-MHV3 and CL12-MHV3; $p < 0,01$ for YAC-MHV3).

Finally, apoptotic intrahepatic NK1.1⁻TCR- β ⁺ cells decreased at 24 hrs p.i. in all MHV3-infected mice ($p < 0,05$ for L2-MHV3 and 51.6-MHV3; $p < 0,01$ for CL12-MHV3 and YAC-MHV3) and remained lower than mock-infected mice at 48 hrs p.i. only in L2-MHV3- ($p < 0,05$) and 51.6-MHV3-infected mice ($p < 0,05$). No variation in the apoptotic NK1.1⁻TCR- β ⁺ cell population was observed at 72 hrs p.i. for all groups of mice (Fig. 14, section II-F).

Unfortunately, the low percentages of apoptotic NK1.1⁺ β TCR⁺ and NK1.1⁻ β TCR⁺ at 72 hrs p.i. in control mice may be due to a lower expression of the β TCR marker.

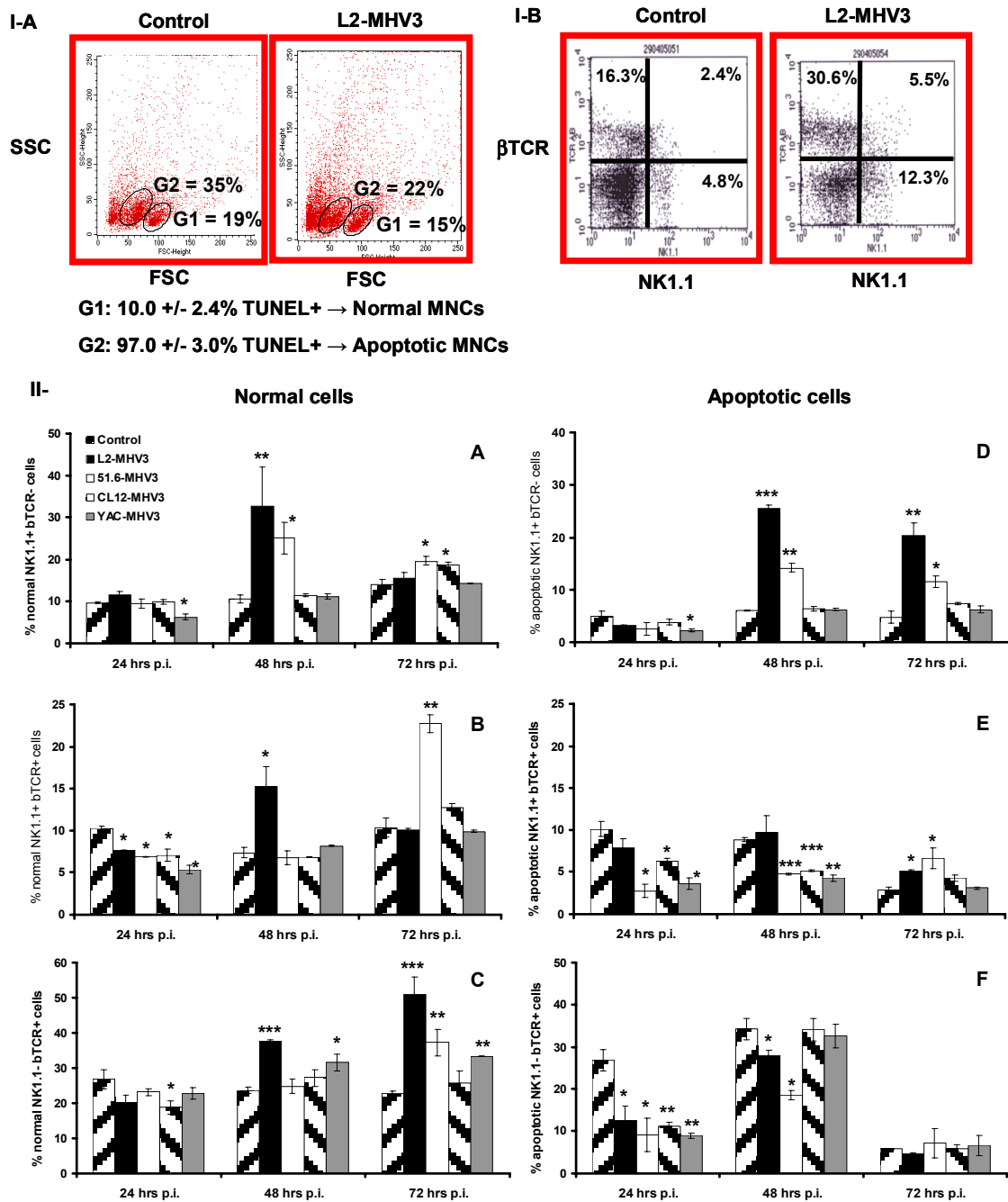


Figure 14. Section I- Expression of TdT-mediated biotin-dUTP nick-end labelling⁺ cells in normal (G1 region) and apoptotic (G2 region) intrahepatic mononuclear cells from mock- and L2-mouse hepatitis virus type 3 (MHV3)-infected C57BL/6 mice (A) and dot plots of the double immunolabelling fluorescein isothiocyanate-NK1.1 and phycoerythrin-T cell receptor (TCR)- β from mock- and L2-MHV3-infected C57BL/6

mice (B). **Section II-** Normal (A, C, E) and apoptotic (B, D, F) intrahepatic NK1.1⁺βTCR⁻ (A, B), NK1.1⁺βTCR⁺ (C, D) and NK1.1⁻βTCR⁺ (E, F) cells in mock-, L2-MHV3-, 51.6-MHV3-, CL12-MHV3- and YAC-MHV3-infected C57BL/6 mice at various times post-infection. Three mice were used in each experimental group. The cells were analyzed using a fluorescence activated cell sorter (FACScan) flow cytometer. A total of 10 000 events were recorded. The percentages of these cell populations at different times p.i. were compared to their respective controls. The results were representative of two different experiments. (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)

3.2.4.6- Relationships between hepatic NK/NK-T cells ratios and hepatitis levels

To verify if the imbalance in NK and NK-T cells correlates with the viral pathogenicity, the NK/NK-T cell ratios in normal and apoptotic MNCs in the livers from groups of three C57BL/6 mice infected with 1000 TCID₅₀ of pathogenic L2-MHV3, low attenuated 51.6-MHV3, highly attenuated CL12-MHV3 or non-pathogenic YAC-MHV3 viruses were calculated and compared to mock-infected mice.

The NK/NK-T cells ratios in normal cell population (G1 region) increased as early as 24 hrs p.i. in pathogenic L2-MHV3-infected mice (p<0,05) and non-significantly at 48 hrs p.i. This ratio also increased in low attenuated 51.6-MHV3-infected mice from 24 hrs (p<0,05) to 48 hrs p.i. (p<0,01) but decreased thereafter at 72 hrs p.i. (p<0,05). Only a slight increase was noted with the highly attenuated CL12-MHV3 variant at 24 hrs p.i. (p<0,05) and no significant variation was observed with the non-pathogenic YAC-MHV3 virus (Table V).

On the other hand, intrahepatic NK/NK-T cell ratios of the apoptotic cell population (G2 region) increased strongly in L2-MHV3-infected mice from 48 hrs to 72 hrs p.i. (p<0,01 for both times). This phenomenon was also observed in the livers from 51.6-MHV3-infected mice but only at 48 hrs p.i. (p<0,001). Furthermore, these NK/NK-T cell ratios were less increased in the livers from CL12-MHV3- and YAC-MHV3-infected mice at 48 hrs p.i. (p<0,05 for both viruses) (Table V).

Table V. Normal and apoptotic intrahepatic natural killer (NK)/NK-T cell ratios in pathogenic L2-mouse hepatitis virus type 3 (MHV3)-, low attenuated 51.6-MHV3-, highly attenuated CL12-MHV3- and non-pathogenic YAC-MHV3-infected C57BL/6 mice at various times post-infection

| Cell populations | Viral infection ¹ | Times post-infection (hrs) | | |
|------------------|------------------------------|----------------------------|----------------|---------------|
| | | 24 | 48 | 72 |
| Normal cells | Control | 0,94 ± 0,04 | 1,45 ± 0,11 | 1,35 ± 0,07 |
| | L2-MHV3 | 1,51 ± 0,10* | 2,14 ± 0,95 | 1,54 ± 0,31 |
| | 51.6-MHV3 | 1,38 ± 0,17* | 3,72 ± 0,49** | 0,86 ± 0,19* |
| | CL12-MHV3 | 1,39 ± 0,23* | 1,67 ± 0,09 | 1,46 ± 0,25 |
| | YAC-MHV3 | 1,18 ± 0,24 | 1,36 ± 0,11 | 1,43 ± 0,04 |
| Apoptotic cells | Control | 0,49 ± 0,14 | 0,68 ± 0,03 | 1,67 ± 0,62 |
| | L2-MHV3 | 0,40 ± 0,18 | 2,63 ± 0,61** | 3,97 ± 0,61** |
| | 51.6-MHV3 | 0,92 ± 0,69 | 3,01 ± 0,25*** | 1,73 ± 0,48 |
| | CL12-MHV3 | 0,61 ± 0,11 | 1,25 ± 0,10* | 1,73 ± 0,22 |
| | YAC-MHV3 | 0,62 ± 0,20 | 1,48 ± 0,18* | 2,04 ± 0,31 |

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. ¹ Three mice were used in each experimental group. The ratios of percentages of NK and NK-T cells from MHV3-infected mice were compared with those from mock-infected mice.

3.2.4.7- Permissivity of NK and NK-T cells to viral infection by the pathogenic L2-MHV3, low attenuated 51.6-MHV3, highly attenuated CL12-MHV3 and non-pathogenic YAC-MHV3 viruses

In order to verify if the apoptosis of NK and NK-T cells is related to the viral replication of the different MHV3 variants, intrahepatic MNCs were collected from uninfected mice, infected *in vitro* (m.o.i. of 0,1-1,0) during 48 hrs and then phenotyped using polyclonal anti-MHV3 anti-sera with anti-DX5 (NK cells) or CD1d:Ig (NK-T cells) antibodies. The DX5⁺MHV3⁺ and CD1d:Ig⁺MHV3⁺ cells were compared to mock-infected cells in the entire DX5⁺ or CD1d:Ig⁺ cell populations.

As shown in the Figure 15, higher percentages of DX5⁺ cells were infected with the attenuated 51.6-MHV3 and CL12-MHV3 variants when compared to non-pathogenic YAC-MHV3 and pathogenic L2-MHV3 viruses (Figs. 15A-D). On the other hand, the percentages of NK-T cells phenotyped with a CD1d:Ig fusion protein, expressing viral proteins following infection with the 51.6-MHV3 and CL12-MHV3 variants, were higher than those infected with the L2-MHV3 and YAC-MHV3 viruses (Figs. 15E-H).

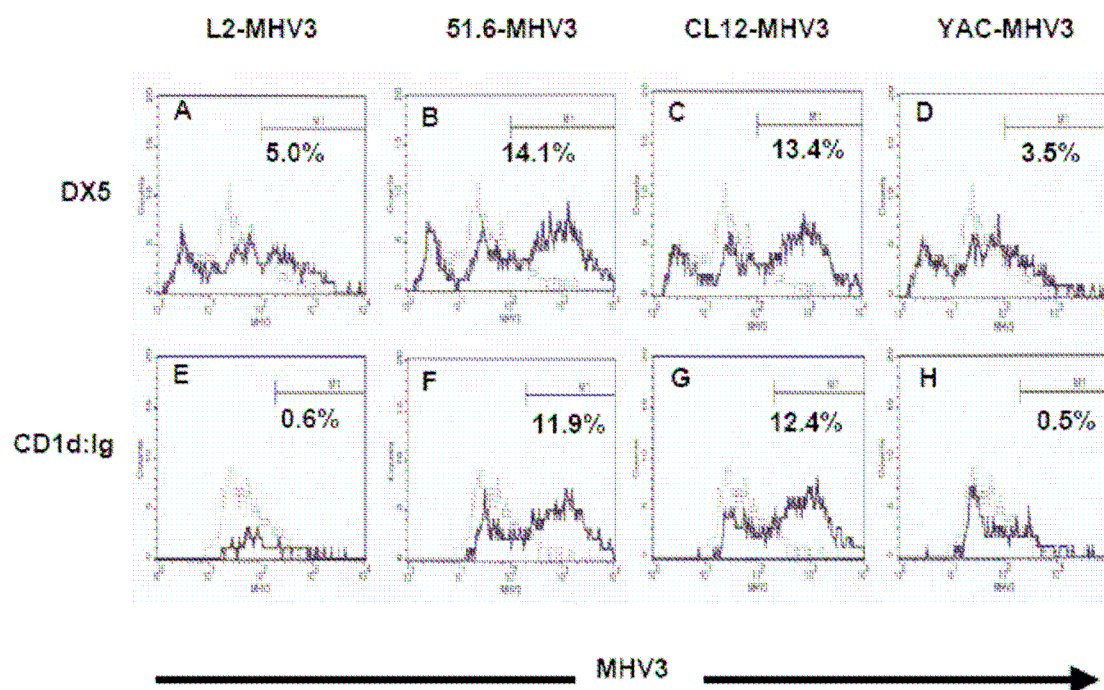


Figure 15. Expression of mouse hepatitis virus type 3 (MHV3) proteins in the intrahepatic DX5⁺ (A-D) cells and CD1d:Ig⁺ (E-H) cells population infected *in vitro* with the L2-MHV3 (A, E), 51.6-MHV3 (B, F), CL12-MHV3 (C, G) and YAC-MHV3 (D, H) viruses. The cells were analyzed using a fluorescence activated cell sorter (FACScan) flow cytometer. A total of 10 000 events were recorded. The DX5⁺MHV3⁺ and CD1d:Ig⁺MHV3⁺ cells from virally infected cells (—) were compared to mock-infected cells (---) in the entire DX5⁺ or CD1d:Ig⁺ cell population.

3.2.5- Discussion

In the present study, fulminant hepatitis induced by the pathogenic L2-MHV3 virus was associated to a decrease in the production of intrahepatic IL-10, TGF- β , PGE₂, an increase in the percentages of apoptotic NK and NK-T cells and at a lesser extend, a decrease in the IFN- γ /IL-4 ratio. KC and LSEC, which are target cells for pathogenic L2-MHV3 (KC⁺, LSEC⁺) virus, are involved in a higher decrease of

immunosuppressive cytokines, whereas KC also play a role in NK/NK-T disorders during the acute viral hepatitis. Indeed, the highly attenuated CL12-MHV3 (KC-, LSEC-) viral variant had a lower impact on suppressive cytokines and apoptosis of NK or NK-T cells when compared to the low attenuated 51.6-MHV3 (KC+, LSEC-) variant.

The use of MHV3 variants which possess different cell tropisms is an efficient system to dissect the *in vivo* and *in vitro* roles for LSEC, KC and T_{reg} cells in the establishment of intrahepatic disorders, resulting from altered immune tolerance and the activation of natural immune responses sustained by NK and NK-T cells. The results shown in this study have been summarized in Table VI.

Table VI. Summary of immunological observations in livers from C57BL/6 mice infected with pathogenic L2-mouse hepatitis virus type 3 (MHV3), low attenuated 51.6-MHV3, highly attenuated CL12-MHV3 and non-pathogenic YAC-MHV3 viruses

| | L2-MHV3* | 51.6-MHV3 | CL12-MHV3 | YAC-MHV3 |
|---|----------------|-----------|-----------|----------|
| % Normal NK cells | ↑ [†] | ↑ | — | — |
| % Normal NK-T cells | ↑ | ↑ | ↓↑ | ↓↑ |
| % Normal T cells | ↑↑ | ↑ | — | ↑↑ |
| Normal NK/NK-T ratio | ↑ | ↑↑ | ↑ | — |
| % Apoptotic NK cells | ↑↑ | ↑↑ | — | — |
| % Apoptotic NK-T cells | ↑ | ↓↑ | ↓ | ↓ |
| % Apoptotic T cells | ↓ | ↓ | ↓↑ | ↓↑ |
| Apoptotic NK/NK-T | ↑↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| CD4⁺FoxP3⁺ cells | ↑ | — | — | — |
| IL-10 | ↓ | ↑ | ↑ | ↑↑ |
| TGF-β | — | ↑ | ↑ | ↑ |
| PGE₂ | — | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ |
| IFN-γ | ↓↓ | ↓↑ | ↓↑ | ↓↑ |
| IL-4 | ↓ | ↑↑ | ↓↑ | — |
| IFN-γ/IL-4 ratio | ↑↓ | — | ↓↑ | ↓↑ |

Three mice were used in each experimental group. [†] ↑, increase; ↓, decrease; ↑↓ or ↓↑, variation during infection; —, similar to mock-infected mice.

NK: natural killer; IL: interleukin; TGF: transforming growth factor; PGE₂: prostaglandin E₂; IFN: interferon; FoxP3: forhead box P3.

The integrity of hepatic immunocompetent cells such as KC and LSEC is required to preserve the immune tolerance characteristic of the liver (Karrar *et al.*, 2007; You *et al.*, 2008). These cells are responsible for the production of immunosuppressive cytokines such as IL-10, TGF-β and PGE₂. Our results indicate that all the suppressive

cytokines tested in this study, either decreased or were not further induced in the livers from mice infected with the L2-MHV3 virus. The absence of TGF- β , IL-10 and PGE₂ in livers from pathogenic L2-MHV3-infected mice may favour a switch from a tolerance to an inflammatory state. Infections with attenuated variants of MHV3, however, induced higher level of immunosuppressive cytokines or a delayed production of the latter. It has been demonstrated previously that the attenuation levels of virus variants reflect their inability to infect LSEC (51.6-MHV3) or LSEC and KC (CL12-MHV3) (Martin *et al.*, 1994), suggesting that their milder virulent phenotype may depend on the integrity of LSEC and KC cells and their role in the control of liver inflammation through the production of immunosuppressive cytokines. In addition, the lower disturbance in immunosuppressive cytokines induced by the higher attenuated CL12-MHV3 variant when compared to the low attenuated 51.6-MHV3 variant indicates that the integrity of KC cells is important in the control of inflammatory responses during acute viral hepatitis. Importantly, LSEC cells may also produce immunosuppressive cytokines, thus contributing to the reduction of the inflammatory response and concomitant pathology, as observed in livers from 51.6-MHV3-infected mice (KC+, LSEC-), when compared to mice infected with the pathogenic L2-MHV3 (KC+, LSEC+) virus.

The sources of the immunosuppressive cytokines were associated not only with LSEC and/or KC but also to T_{reg} cells. Indeed, the percentages of intrahepatic FoxP3⁺ cells in the CD4⁺ cell population slightly increased in liver from pathogenic L2-MHV3-infected mice only. The decrease in immunosuppressive cytokines suggests that T_{reg} cells may be rendered anergic or unresponsive during the first days of infection. However, other types of T_{reg} cells, such as adaptative Tr1 or Th3 cells, may be implicated in the production of the immunosuppressive cytokines (Vignali *et al.*, 2008).

It is also known that IL-10 and TGF- β determine the levels of IFN- γ inhibition (Schroder *et al.*, 2003), suggesting that a decrease in IL-10 and TGF- β may favour the increase of IFN- γ and a subsequent inflammatory response. However, IFN- γ levels did not increase in livers from pathogenic L2-MHV3-infected mice. On the other hand, the

level of the immunosuppressive cytokines IL-10, TGF- β and PGE₂, increased in livers from all groups of mice infected with the attenuated MHV3 variants in accordance with their pathogenic levels and times post-infection. The inhibitory effects of IL-10 and TGF- β on IFN- γ may not be consequent completely to the lower production of IFN- γ during the first 2 days of infection as a significant increase in IFN- γ production was noted at 72 hrs p.i., a time-point at which IL-10 and TGF- β increased in livers from all attenuated MHV3-infected mice.

The use of attenuated viral variants which have lost their ability to replicate in LSEC and/or KC cells involved in the control of liver tolerance allowed us to evaluate the role for these cells in viral acute hepatitis. We have demonstrated previously that viral replication cannot explain the levels of hepatitis, as similar viral titres were found in livers from mice infected with pathogenic L2-MHV3, low attenuated 51.6-MHV3, highly attenuated CL12-MHV3 or non-pathogenic YAC-MHV3 viruses (Lamontagne et Dupuy, 1984; Lamontagne *et al.*, 1994). Viral pathogenicity correlates more with the time of appearance of virus titres in the liver than the level of viral titres (Lamontagne *et al.*, 1994). These observations support the hypothesis that the pathogenicity of the viral variants reflects their ability to trigger the inflammatory response rather than their capacity to replicate. As expected, the macroscopic evaluation of livers from MHV3-infected mice correlated with the levels of hepatitis described by Martin *et al.* (1994). Previous histopathological studies have shown that the pathogenic L2-MHV3 virus induces extensive necrotic foci in liver, whereas few perivascular inflammatory foci are observed transiently in mice infected with the non-pathogenic YAC-MHV3 variant (Le Prevost *et al.*, 1975). Histopathological studies have revealed dramatic effects in L2-MHV3-infected mice for which hepatocellular necrosis in the presence of inflammatory cells was evident in the presence of high transaminase activity in serum (Lamontagne *et al.*, 1989b; Lamontagne *et al.*, 1994). Moderate liver necrosis and infiltration of inflammatory cells, however, were seen in both 51.6-MHV3- and CL12-MHV3-infected mice in which low and no transaminase activity was detected. Thus, the histopathological features of viral infection by the viral variants reflect the levels of

immunosuppressive cytokines, such as IL-10 and PGE₂, rather than inflammatory cytokines such as IFN- γ .

It is tempting to suggest that the delayed production of PGE₂ by LSEC may result in the onset of the acute hepatitis observed in our study. It has been shown that administration of PGE₂ to susceptible Balb/c mice protects them against the intravascular coagulation induced during MHV3 infection (Abecassis *et al.*, 1987). PGE₂ production was higher in livers from mice infected with non-pathogenic YAC-MHV3 and highly attenuated CL12-MHV3 viruses. The level of PGE₂ remained higher in livers from lower attenuated 51.6-MHV3-infected mice than in L2-MHV3-infected mice. These observations not only confirm the protective role for PGE₂ during acute viral hepatitis, but also suggest that the permissiveness of LSEC cells to viral infection may play a major role in the production of PGE₂ during acute hepatitis.

The loss of KC and/or LSEC due to replication of pathogenic L2-MHV3 virus cannot explain the decrease in IFN- γ production. NK cells are generally the major sources of IFN- γ during the early stages of infection, and NK-T cells may contribute to this effector response in certain cases (Seki *et al.*, 1998; Hammond *et al.*, 1999; Gansuud *et al.*, 2002; Roland *et al.*, 2006). Intrahepatic NK1.1 cells increased in mice infected with the pathogenic L2-MHV3 and low attenuated 51.6-MHV3 viruses. Notwithstanding the recruitment of NK1.1 cells, the levels of IFN- γ decreased in the liver of L2-MHV3- (24 hrs to 72 hrs p.i.) and 51.6-MHV3-infected mice (24 hrs to 48 hrs p.i.). These observations reflect the high levels of apoptosis observed in intrahepatic recruited NK1.1 cells in the liver from these infected mice, as NK1.1 cells were not or less recruited in the liver during infections with the highly attenuated CL12-MHV3 and non-pathogenic YAC-MHV3 viruses and did not become apoptotic.

The IFN- γ /IL-4 ratio was used to reflect the NK/NK-T cell ratio during the hepatitis. IL-4 is considered as an immunosuppressive cytokine which contributed to induce a Th2 response and is produced by NK-T cells, whereas IFN- γ is mainly secreted by NK cells. This ratio may also indicate the Th1/Th2 equilibrium in liver. IL-4 was reported to be implicated in oral tolerance toward colitis-extracted proteins for long

term gene therapy (Ilan, 1999). This cytokine was also associated to a prolonged survival of skin allograft in a mouse model (Ding *et al.*, 2007) and the inhibition of E-selectin and ICAM-1 on TNF- α -activated bovine aortic endothelial cells which may contribute to xenotransplantation (Chen *et al.*, 2005). However, some studies have suggested negative roles for NK-T cells in the development of aggressive hepatitis induced by ConA or α -GalCer (Ajuebor *et al.*, 2005; Biburger et Tiegs, 2005). This observation was supported by a NK-T cell-dependent increased production of IL-4. Production of intrahepatic IL-4 was impaired in pathogenic L2-MHV3-infected mice in contrast to attenuated 51.6-MHV3- and CL12-MHV3-infected-mice. Moreover, no increase in intrahepatic NK-T cells or their apoptosis was observed during infection with the highly attenuated CL12-MHV3 and non-pathogenic YAC-MHV3 variants, in contrast with L2-MHV3 or 51.6-MHV3 infections.

The decrease of intrahepatic IFN- γ and IL-4, production thus may be explained partially by the apoptosis of the NK and NK-T cells due to their permissivity to viral replication. We have demonstrated recently that myeloid NK cells are susceptible to viral replication and apoptosis via the formation of syncytium (Lehoux *et al.*, 2004). However, the low percentages of L2-MHV3-infected DX5⁺MHV3⁺ and CD1d:Ig⁺MHV3⁺ cells were surprising, and may reflect the lower number of viable DX5⁺ and CD1d:Ig⁺ cells when infected with this virus. On the contrary, the low percentages of YAC-MHV3-infected NK and NK-T cells explain the higher numbers of viable NK or NK-T cells, as this virus did not adequately infect these cells. It was demonstrated that the non-pathogenic YAC-MHV3 variant has limited cell tropisms when compared to the pathogenic L2-MHV3 virus (Le Prevost *et al.*, 1975; Lamontagne *et al.*, 1989b; Martin *et al.*, 1994).

The imbalance between inflammatory and immunosuppressive cytokines may influence the intrahepatic lymphoid cell subpopulations. Our previous studies have shown that immunodeficiencies in B and T cells are induced after 72 hrs p.i. in pathogenic L2-MHV3-infected C57BL/6 mice but not in non-pathogenic YAC-MHV3-infected mice (Lamontagne *et al.*, 1989b). Also, we have demonstrated previously that

the attenuated 51.6-MHV3 and CL12-MHV3 variants induce lower immunodeficiencies in B and T cells in accordance with their levels of pathogenicity (Lamontagne *et al.*, 1994). It is well known that IL-10 and PGE₂ are important to reduce the activation of antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells recruited in the liver (Knolle *et al.*, 1998; Uhrig *et al.*, 2005). TGF- β is a cytokine secreted by LSEC and KC involved in the suppression of T cell proliferation (Schroder *et al.*, 2003). Indeed, decreased levels of these cytokines can lead to overwhelming T cell activation. In addition, intrahepatic IL-10 and TGF- β may be also secreted by type 1 regulatory (Tr1) or T helper (Th3) cells, respectively, inhibiting cellular activation (Jonuleit *et al.*, 2002).

In conclusion, our results suggest that the acute hepatitis induced by the pathogenic L2-MHV3 virus is related to a decreased production in immunosuppressive cytokines produced mainly by KC and LSEC and by the apoptosis of intrahepatic recruited NK and NK-T cells. Lower levels of hepatitis reflect the KC and LSEC tropisms of attenuated MHV3 variants. The results obtained in this work suggest that innate lymphoid cells, such as NK and NK-T cells, may also play a role in the onset of acute hepatitis, as they may be disturbed in acute hepatitis and their imbalance may lead to abnormal inflammatory responses.

Further work is in progress to demonstrate the effect of viral replication of variants in *in vitro*-purified LSEC and KC, and on NK cells on the production of PGE₂, IL-10, and TGF- β involved in immune hepatic tolerance and on antiviral and inflammatory IFN- γ production. Considering these facts, *in vivo* studies will be conducted to assess the effect of repletion with recombinant cytokines on immune disorders induced during acute hepatitis.

3.2.6- Acknowledgements

This work was supported by a grant from NSERC-Canada. The authors thank Dr. T. Scorza and Dr. K. Rashidan for revising this manuscript. A. J. was supported by a NSERC fellowship.

3.3- Article 3

L'objectif de cet article était de démontrer le mécanisme par lequel les cellules NK seraient en mesure de produire de l'IFN- γ lors de l'hépatite aiguë induite chez la souris susceptible C57BL/6 par le virus pathogène L2-MHV3 en présence des IL-12 et IL-18. L'originalité de cet article a été de montrer que l'IL-12 et l'IL-18 pouvaient induire une production synergique d'IFN- γ chez des cellules NK infectées par un coronavirus. Ainsi, l'absence de production de ces cytokines dans le foie des souris infectées aurait un rôle crucial dans le développement de l'hépatite aiguë. Également, cette étude a permis de mettre en évidence le rôle inhibiteur de la molécule CEACAM1a de même que l'importance de la voie de signalisation intracellulaire p38 MAPK dans cette production synergique d'IFN- γ . En fait, cet article montre pour la première fois que la molécule CEACAM1a peut réguler la production d'IFN- γ chez des cellules NK activées et infectées par un coronavirus.

Mon rôle dans cet article a été d'effectuer toutes les expériences présentées dans cet article, de procéder à l'analyse de tous les résultats et de participer à la rédaction complète de l'article, en collaboration avec ma directrice de recherche.

A SYNERGISTIC INTERFERON- γ PRODUCTION IS INDUCED BY MOUSE
HEPATITIS VIRUS IN IL-12/IL-18-ACTIVATED NK CELLS AND MODULATED
BY CEACAM1a RECEPTOR

A. JACQUES, C. BLEAU, C. TURBIDE, N. BEAUCHEMIN & L. LAMONTAGNE

Département de microbiologie et d'immunologie

Université de Montréal, Canada

En soumission à la revue *Journal of Leukocyte Biology*

De: Jacques Alexandre
À: Jacques Alexandre
Cc:
Objet : J0908-524 Receipt of Paper by Journal of Leukocyte Biology
Pièces jointes :

Date: jeu. 2008-09-04 16:32

Dear Jacques Alexandre,

On September 4, 2008, I received your manuscript entitled "A synergistic interferon- γ production is induced by mouse hepatitis virus in IL-12/IL-18-activated NK cells and modulated by CEACAM1a receptor" by Jacques Alexandre, Bleau Christian, Turbide Claire, Beauchemin Nicole, and Lucie Lamontagne.

Your manuscript has been assigned the Paper #: J0908-524.

You may check on the status of this manuscript by selecting the "Check Manuscript Status" link under the following URL:

(Press/Click on the above link to be automatically sent to the web page.)

If you have not already done so, please have all authors sign the "Mandatory Submission and Copyright Transfer Form" (Link below). Return the completed form to the Journal of Leukocyte Biology, Office of Publications by fax (301-634-7809) or by e-mail (gfallon@faseb.org). A mailing address is also available at the bottom of the form.

Thank you for submitting your work to the Journal of Leukocyte Biology.

Sincerely,

Joost J. Oppenheim, M.D.
Editor-In-Chief
Journal of Leukocyte Biology
9650 Rockville Pike
Bethesda, MD 20814-3998

3.3.1- Abstract

The production of IFN- γ by NK cells, responsible for the control of viral infection, and triggered by IL-12 and IL-18, is greatly impaired during viral hepatitis. The objectives of this study are to identify the mechanism used by mouse hepatitis virus (MHV) type 3 to modulate the production of IFN- γ by NK cells during the acute hepatitis in susceptible C57BL/6 mice. *In vitro* experiments reveal that NK cells, expressing CEACAM1a (the MHV receptor), can produce a higher level of IFN- γ in the presence of both L2-MHV3 virus and IL-12/IL-18. The synergistic production of IFN- γ by NK cells mainly depends on viral replication and involves the p38 MAPK signaling pathway. However, the signal triggered through the engagement of CEACAM1a modulates the production of IFN- γ . *In vivo* studies reveal, however, that impairment of intrahepatic production of IL-12 and IL-18 in MHV3-infected mice and apoptosis of NK1.1⁺ β TCR⁻ cells recruited in the liver lead to low IFN- γ production. Such *in vivo* hepatic disorders induced during the viral infection favour the escape of the MHV3 virus from the NK cells antiviral mechanisms.

3.3.2- Introduction

NK cells are an important arm of the innate immunity against virus-infected cells, bacteria and tumor cells, and exert direct cytotoxicity functions as well as indirect antiviral functions through the secretion of IFN- γ (Biron et Brossay, 2001). The role of intrahepatic NK cells in the outcome of human viral hepatitis is not fully understood. NK cells are known to act as a first line to control many viral infections such as herpes simplex virus type 1, Epstein-Barr virus, human herpesvirus 6 and murine cytomegalovirus (Bukowski *et al.*, 1984; Gosselin *et al.*, 1999). However, human hepatitis C virus (HCV) has developed strategies to evade the detection and elimination by NK cells (Golden-Mason et Rosen, 2006), as it is also suggested by the increased NK cell numbers in the liver of chronic hepatitis B virus-infected patients during the phase of immunotolerance (Sprengers *et al.*, 2006). The liver is enriched in NK and NK-T cells, which play major roles in the control of viral hepatitis infections by limiting viral

replication via an IFN- γ -dependent mechanism. Recently, several studies have demonstrated the importance of the cytotoxic activities of NK cells in preventing the establishment of chronic HCV infections (Herzer *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004).

NK cells are rapidly recruited from the bone marrow and spleen during viral infections (Wang *et al.*, 2005). IL-12, IL-15, IL-18 and IFN- γ enhance the cytotoxic activity of NK cells and further increase the production of IFN- γ by these cells (Gosselin *et al.*, 1999; Biron et Brossay, 2001). Moreover, the production of IFN- γ by NK cells stimulated with IL-12 and IL-18 is dependent on the activation of the immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs) and is regulated through the p38 and ERK-1/2 MAPK pathways (Mavropoulos *et al.*, 2005; Ortaldo *et al.*, 2006). However, little is known about the mechanism involved in the efficient production of antiviral IFN- γ by intrahepatic NK cells during the acute phase of viral hepatitis.

Mouse hepatitis virus type 3 (MHV3) is an excellent model to study the immunological disorders associated with viral hepatitis. MHV3 induces acute and/or chronic hepatitis according to the strain, age and immune status of the mouse. Moreover, MHV3 can replicate in hepatocytes, liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) and Kupffer cells (KC), leading to virus-induced cell death, resulting in a fulminant hepatitis in susceptible C57BL/6 mice and their death within 3 to 5 days post-infection (p.i.) (Martin *et al.*, 1994). We have previously reported that the hepatitis development in pathogenic L2-MHV3-infected C57BL/6 mice is related to a decrease in splenic and myeloid NK cells, due to the formation of syncytia and their subsequent apoptosis (Lehoux *et al.*, 2004). Moreover, *in vivo* depletion of NK cells during MHV infections enhances virus replication which in turn leads to a more pronounced hepatitis (Bukowski *et al.*, 1983). Phenotypic analysis of intrahepatic mononuclear cells has revealed that apoptotic NK and NK-T cells increase in mice infected with the pathogenic L2-MHV3 virus, in contrast to the minor effects associated with the C57BL/6 mice infected with the MHV3 attenuated variants (Jacques *et al.*, 2008). In addition, we have recently demonstrated that viral permissivity of KC, rather than LSEC, plays an important role in

the apoptosis of NK and NK-T cells during acute viral hepatitis, but the mechanisms were not yet identified (Jacques *et al.*, 2008).

IFN- γ is known to play a protective role against the hepatitis induced by various MHV serotypes (Lucchiari *et al.*, 1992; Mello *et al.*, 1993). Very few studies have targeted the efficiency of NK cell functions during MHV infection. Stohlman *et al.* (1983) have observed that, during a MHV-JHM infection, NK cell cytotoxic activity increases in the spleen in absence of IFN- γ production. More recently, it was reported that the addition of IL-12 and IL-18 in susceptible mice led to an increase in IFN- γ production in the liver and better control of the infection, although the IFN- γ -producing cells involved were not identified (Moreira *et al.*, 2004).

MHV infection in susceptible cells depends on the fixation of viral surface proteins to a receptor, identified as the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1a (CEACAM1a). Markel *et al.* (2002a) have shown that CEACAM1 homotypic interactions between NK cells and various target cells inhibit NK cell cytotoxicity. In addition, the engagement of CEACAM1a leads to the inhibition of T cell proliferation and IFN- γ production by NK-T cells (Markel *et al.*, 2002b). In contrast, toll-like receptor-dependent activation of NF- κ B up-regulates the expression of CEACAM1a, whereas IFN- γ down-regulates it, thus decreasing the permissivity of susceptible cells to MHV infection (Vassao *et al.*, 2000; Muenzner *et al.*, 2001). CEACAM1a is expressed at the surface of hepatic cells including LSEC, KC, hepatocytes, NK cells and B cells, but is not or very low expressed in naive CD4⁺ or CD8⁺ T cells (Coutelier *et al.*, 1994; Moller *et al.*, 1996; Godfraind et Coutelier, 1998; Kammerer *et al.*, 1998).

McGilvray *et al.* (1998) reported that the p38 and ERK-1/2 MAPK pathways were activated in peritoneal macrophages infected with the MHV3 virus within the first 30 minutes of infection, suggesting that this effect occurred in response to the fixation of the virus to its receptor. Banerjee *et al.* (2002) suggested that the replication of the MHV-A59 virus was also dependent on the activation of p38 but not the ERK-1/2 MAPK pathway, without further identifying the replication step involved. In this

respect, the effect of the CEACAM1a engagement by MHV surface proteins and the further activation of p38 or ERK-1/2 MAPK on the antiviral function of NK cells remain unknown. The fact that *Ceacam1a*^{-/-} mice are resistant to a MHV-A59 infection suggests an absolute requirement for CEACAM1a in viral infectivity (Hemmila *et al.*, 2004).

In this work, we demonstrate an *in vitro* synergistic production of IFN- γ by NK cells in the presence of both L2-MHV3 virus and IL-12/IL-18, involving the engagement of CEACAM1a receptor, viral replication and p38 MAPK signaling pathway. *In vivo* studies have revealed, however, that this antiviral mechanism was rendered inefficient in MHV3-infected mice by the impairment of intrahepatic productions of IL-12 and IL-18 and the apoptosis of recruited NK1.1⁺ β TCR⁻ cells in the liver.

3.3.3- Materials and methods

3.3.3.1- Mice

Wild type C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories (St-Constant, Québec, Canada). *Ceacam1a* knock-out (*Ceacam1a*^{-/-}) mice were generated by Dr. N. Beauchemin as previously described (Leung *et al.*, 2006). The animals, certified as MHV3-free by the manufacturer, were housed under HEPA-filtered air (Forma Scientific, Marietta, OH, USA). Female mice between 8 and 12 weeks of age were used in all the experiments. The study was conducted in compliance with the regulation from the Animal Committee of the Université du Québec à Montréal (UQAM).

3.3.3.2- Viruses

The pathogenic L2-MHV3 virus is a cloned substrain isolated from the liver of infected DBA2 mice and propagated in L2 cells as previously described (Dupuy et Rodrigue, 1981). The pathogenic properties of the L2-MHV3 virus were assessed regularly.

3.3.3.3- In vivo viral infection

Groups of three or six C57BL/6 mice, according to the experiments, were infected by the intraperitoneal (i.p.) route with 1000 TCID₅₀ of L2-MHV3 virus. Mock-infected mice received a similar volume of RPMI 1640 (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY, USA). At various times p.i., the mice were anesthetized by i.p. injection using ketamine hydrochloride (200 mg/kg) (Vetrepharm Canada Inc., Belleville, Ont, Canada) and xylazine (10 mg/kg) (Bayer Inc., Toronto, Ont, Canada). Mice were bled by section of the portal vein and aorta, as described by Watanabe *et al.* (1992). The livers were harvested following exsanguination.

3.3.3.4- Cells

The continuous mouse fibroblast L2 cell line was grown in RPMI 1640 supplemented with L-glutamine (2 mM), antibiotics (penicillin 100 U/ml and streptomycin 100 mg/ml) (GIBCO Laboratories) and 5% fetal calf serum (FCS) (Gemini Bio-Products, Woodland, CA, USA). L2 cells were used for viral production.

Intrahepatic mononuclear cells (MNCs) were isolated from the liver of mice from each experimental group as previously described (Lamontagne *et al.*, 1997). Briefly, the liver was pressed through a 70 µm cell strainer (Falcon Scientific Co., Montréal, Qc, Canada) which was then washed with 10 ml of RPMI 1640 supplemented with 20% FCS. The cell suspension was then deposited on 7 ml of FCS to allow debris sedimentation, the top layer was then recovered and centrifuged 10 min at 1000g. The supernatants were collected for cytokines quantification by ELISA after being passed through a 0,45 µm filter (Sarstedt Inc., Montreal, Qc, Canada). The cells were resuspended and deposited on the top of a discontinuous Percoll gradient (45% and 67% Percoll in PBS) (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden; GIBCO Laboratories) and centrifuged for 30 min at 1000g. The MNCs were collected at the interface of the 45% and 67% Percoll layers and washed with RPMI 1640 supplemented with 20% FCS to finally be adjusted to $0,5 \times 10^6$ or $1,0 \times 10^6$ cells/ml.

Myeloid MNCs were isolated from femurs of uninfected mice. Briefly, the femurs were soaked in 70% ethanol for 2-5 min and washed subsequently with RPMI 1640 supplemented with 20% FCS. The femurs were then excised from the surrounding muscle tissues. The marrow was flushed using a syringe filled with RPMI 1640 supplemented with 20% FCS and fitted with a needle calibre 26_{G3/8} (Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA). The cell suspension was thereafter purified by a lymphoprep gradient (Cederlane, Hornby, Ont, Canada), washed and adjusted to 10⁶ cells/ml.

Intrahepatic or myeloid NK cells were depleted or purified by positive selection using the CD49b (DX5 or Pan NK) antibody coupled to microbeads (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada). Total myeloid MNCs, purified DX5⁺ cells or “DX5-depleted” MNCs were resuspended in RPMI 1640 supplemented with 20% FCS and adjusted to 10⁶ cells/ml.

In all experiments, the cell viability, ranging from 90 to 100%, was assayed by a trypan blue exclusion test.

3.3.3.5- *Ex vivo* viral infection

Intrahepatic MNCs were isolated from six mock- or L2-MHV3-infected C57BL/6 mice after 72 hrs of infection and were seeded in 24-well plates at concentrations of 0,5x10⁶ cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 20% FCS. Recombinant murine IL-12 (rIL-12) or rIL-18 (BioSource, Montréal, Qc, Canada) were added to a final concentration of 0,1 ng/ml and 25 ng/ml respectively. The cells were then incubated at 37°C, under 5% CO₂ for 24 hrs. The supernatants were collected for IFN- γ quantification by ELISA.

3.3.3.6- *In vitro* viral infection

MNCs were isolated from the livers or bone marrows from uninfected wild type or *Ceacam1a*^{-/-} C57BL/6 mice and cells were thereafter seeded in 24-well plates at a concentration of 10⁶ cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 20% FCS. rIL-12 or rIL-18 were added to a final concentration of 0,1 ng/ml and 25 ng/ml respectively. In some experiments, SB203580 and U0126, specific p38 and ERK-1/2 MAPK inhibitors (Calbiochem, San Diego, CA, USA), were added to a final concentration of 10 µg/ml. Different concentrations of sodium stibogluconate (SS) were also added during 15 min to inhibit the SHP-1 phosphatase. A monoclonal murine anti-CEACAM1a antibody (AgB10, produced in rat and affinity-purified on a HiTrap protein G column) was also added at a concentration of 2 µg/10⁶ cells. The cells were infected with a 0,1 to 1 m.o.i. of infectious L2-MHV3 viruses or L2-MHV3 viruses treated for 1 hr with UV and then incubated at 37°C, under 5% CO₂ for 24 hrs. The supernatants were collected for IFN-γ quantification by ELISA.

3.3.3.7- Flow cytometric analysis

Percent of intrahepatic NK1.1⁺βTCR⁻ cells from *in vivo* mock- or L2-MHV3-infected C57BL/6 mice were determined by double immunolabeling. The intrahepatic MNCs were isolated and 10⁶ cells were resuspended in 1 ml of PBS and further incubated on ice in the presence of a CD16/CD32 blocker (Pharmingen, Toronto, Ont, Canada) for 15 min. Thereafter, the cells were incubated 30 min with 1 µg of fluorescein isothiocyanate (FITC)-NK1.1 (clone PK136, mouse IgG2aκ, Pharmingen) and 1 µg phycoerythrin (PE)-βTCR (clone H57-597, Armenian Hamster IgG2 λ1, Pharmingen). The cells were then washed in PBS and fixed overnight at 4°C in PBS, pH 7,2 containing 1% formaldehyde (Fisher Scientific Co.). Flow cytometric analyses were performed on a fluorescence-activated cell flow cytometer (FACScan) and with the Cell Quest software (Becton-Dickinson, Mountain View, CA). Ten thousand cells were analyzed per sample.

3.3.3.8- Cytokine determinations by ELISA assays

IL-12, IL-18 and IFN- γ levels produced in liver extracts from mock- or L2-MHV3-infected C57BL/6 mice and in supernatants from *ex vivo* or *in vitro* infections were determined using the mouse IL-12 (p70), mouse IL-18 and mouse IFN- γ BD OptEIA ELISA Sets (BD Biosciences, Mississauga, Ont, Canada).

3.3.3.9- Statistical analysis

For *in vivo* and *ex vivo* studies, statistical analyses were performed using an ANOVA test. For *in vitro* studies, statistical analyses were performed using a Student's t test (two-tailed, paired). All statistical comparisons were calculated with the GraphPad Prism 4.03 software. Error bars represent standard errors and a value of $p < 0,05$ was considered significant.

3.3.4- Results

3.3.4.1- MHV3 infection synergizes the production of IFN- γ by intrahepatic MNCs in the presence of IL-12 and IL-18

To verify the ability of intrahepatic MNCs from L2-MHV3-infected mice to produce IFN- γ during the acute phase of the hepatitis, intrahepatic MNCs from six mock- or L2-MHV3-infected C57BL/6 mice were isolated after 72 hrs of infection and activated *ex vivo* with rIL-12/rIL-18 during 24 hrs. IFN- γ levels were then evaluated in cell supernatants. As shown in Figure 16 (Section I), intrahepatic MNCs isolated from L2-MHV3-infected mice produced slightly more IFN- γ than cells from mock-infected mice in the absence of stimulation ($p < 0,01$). Addition of rIL-12 and rIL-18 increased the production of IFN- γ by MNCs from both L2-MHV3- and mock-infected mice in a comparable manner ($p < 0,001$).

To confirm the role of the MHV3 virus in the production of IFN- γ by intrahepatic MNCs, these cells were isolated from uninfected C57BL/6 mice and infected *in vitro* with the L2-MHV3 virus for 24 hrs in the presence of rIL-12, rIL-18 or both. The IFN- γ released in the cell supernatants was then quantified. As shown in the Figure 16 (Section II-A), L2-MHV3 infection of intrahepatic MNCs induced low but significant IFN- γ production ($p < 0,001$). Addition of rIL-12 ($p < 0,05$), rIL-18 ($p < 0,001$) or rIL-12/rIL-18 ($p < 0,001$) to uninfected intrahepatic MNCs further increased the IFN- γ production (Fig. 16, Sect. II-A to II-D). Production of IFN- γ by intrahepatic MNCs, however, synergistically increased when the cells were treated *in vitro* with both the L2-MHV3 virus and cytokines ($p < 0,01$ for all treatments when compared to the uninfected treated cells) (Fig. 16, Sect. II-B to II-D). These results indicate that IL-12 and IL-18 act in synergy with the L2-MHV3 virus on a virally susceptible cell type present in the intrahepatic MNC culture from uninfected mice to produce IFN- γ .

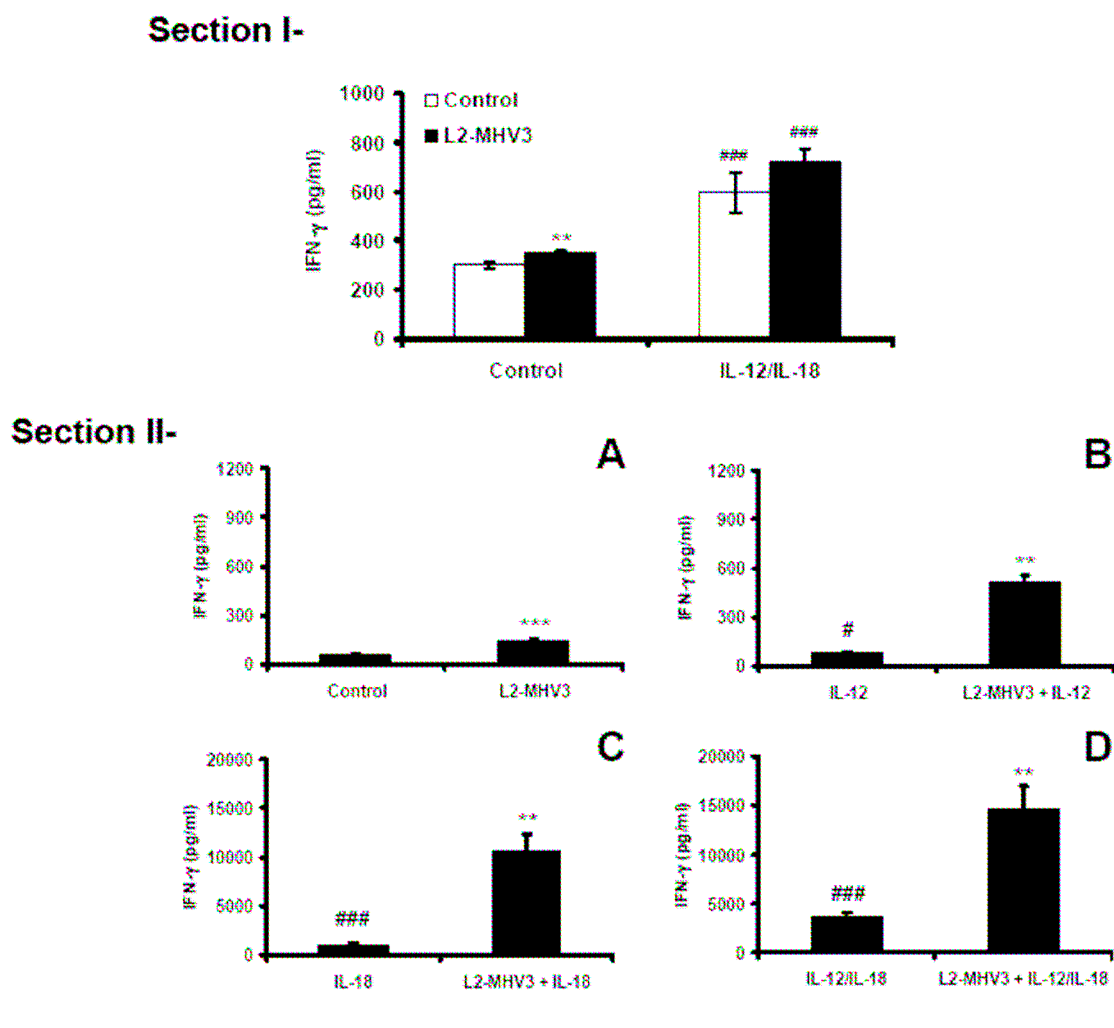


Figure 16. Section I- Production of IFN- γ from intrahepatic MNCs purified from mock- and L2-MHV3-infected C57BL/6 mice after 72 hrs and treated *ex vivo* during 24 hrs with rIL-12 and rIL-18. Six mice were used in each experimental group. The IFN- γ levels were quantified in supernatants by ELISA. (** $p < 0,01$ when compared to untreated mock-infected cells; (### $p < 0,001$ when compared to respective untreated cells). **Section II-** Production of IFN- γ in *in vitro* mock-infected and L2-MHV3-infected intrahepatic MNCs from C57BL/6 mice at 24 hrs p.i. in the absence (A) or presence of rIL-12 (B), rIL-18 (C) and rIL-12/rIL-18 (D). The IFN- γ levels were quantified in supernatants by ELISA. (** $p < 0,01$ and *** $p < 0,001$ when compared to

respective untreated or treated uninfected cells, # $p < 0,05$ and ### $p < 0,001$ when compared to untreated uninfected cells)

3.3.4.2- NK cells are responsible for the production of IFN- γ in response to a combined treatment with the L2-MHV3 virus and IL-12/IL-18

It was previously demonstrated that the production of IFN- γ in the liver in response to IL-12 administration depends on NK cells (Pien et Biron, 2000). In order to verify if the IFN- γ response, induced in the presence of rIL-12 and rIL-18 during an *in vitro* L2-MHV3 infection, mainly depends on NK cells, intrahepatic MNCs were isolated from uninfected mice and NK cells were removed with an anti-DX5 antibody coupled to microbeads (<2% DX5⁺ cells remaining in the DX5-depleted cells preparation). Total MNCs and DX5-depleted cell preparations were thereafter *in vitro* infected with the L2-MHV3 virus in the presence of rIL-12/rIL-18. The IFN- γ level strongly decreased in DX5-depleted cells (1201 \pm 146 pg/ml) compared to total intrahepatic MNCs (8236 \pm 198 pg/ml) ($p < 0,001$), when infected with the L2-MHV3 virus and further treated with rIL-12/rIL-18. Indeed, the levels of IFN- γ were comparable to those measured with uninfected rIL-12/rIL-18-treated cells from total intrahepatic MNCs (1403 \pm 316 pg/ml) or DX5-depleted cells (1047 \pm 61 pg/ml). The number of positively selected intrahepatic NK cells from uninfected mice remains too low to allow detection of high levels of IFN- γ in cell cultures by ELISA.

However, intrahepatic NK cells were recruited in the liver from the bone marrow or spleen in L2-MHV3-infected mice (Lehoux *et al.*, 2004; Jacques *et al.*, 2008). NK cell numbers are significantly higher in the bone marrow when compared to the spleen or the liver, thus bone marrow MNCs were then used as a source of NK cells. MNCs from bone marrow were isolated and NK cells were thereafter purified with an anti-DX5 antibody coupled to microbeads. Total myeloid MNCs, purified DX5⁺ cell (96% purity) and DX5-depleted cell (<2% DX5⁺ cells remaining) preparations were then infected *in vitro* with the L2-MHV3 virus in the presence of rIL-12 and rIL-18. As shown in Table

VII, low IFN- γ was produced by total myeloid MNCs infected with the L2-MHV3 virus or treated only with rIL-12/rIL-18. However, addition of these cytokines to L2-MHV3-infected myeloid MNCs induced a synergistic production of IFN- γ when compared to untreated L2-MHV3-infected cells ($p < 0,001$) or to uninfected rIL-12/rIL-18-treated cells ($p < 0,001$). No significant IFN- γ was produced by uninfected or L2-MHV3-infected DX5-depleted myeloid MNCs, treated or not with rIL-12 and rIL-18, suggesting that NK cells were the only cells involved in the production of IFN- γ . Purified DX5⁺ cells produced IFN- γ when stimulated with rIL-12/rIL-18 ($p < 0,001$ compared to untreated cells) and responded in a synergistic manner when infected with the L2-MHV3 virus ($p < 0,001$ compared to rIL-12/rIL-18-treated cells). These results indicate that NK cells are involved in the synergistic production of IFN- γ induced both by the L2-MHV3 virus and the cytokines.

Table VII. Production of IFN- γ at 24 hrs p.i. in L2-MHV3-infected myeloid MNCs from wild type C57BL/6 mice in the absence or presence of rIL-12/rIL-18.

| Myeloid cells ^a | Interferon (IFN)- γ (pg/ml) | | | |
|----------------------------|------------------------------------|---------|-----------------|----------------------------|
| | Control | L2-MHV3 | rIL-12/rIL-18 | L2-MHV3 + rIL-12/rIL-18 |
| Total cells | < 31,3 ^b | < 31,3 | < 31,3 | 799 \pm 253*** |
| DX5 depleted cells | < 31,3 | < 31,3 | 43 \pm 33 | 127 \pm 64 |
| Purified DX5 cells | < 31,3 | < 31,3 | 646 \pm 99*** | 1665 \pm 277*** |

^a Myeloid MNCs were obtained from wild type C57BL/6 mice and infected with the L2-MHV3 virus in the presence of rIL-12/rIL-18 for 24 hrs. DX5-depleted cells and purified DX5⁺ cells were obtained by treatment of total myeloid MNCs with the CD49b

(DX5 or Pan NK) mab coupled to microbeads (<2% DX5⁺ cells remaining in the DX5-depleted cells preparation; 96% purity in the purified fraction). The IFN- γ levels were quantified in supernatants by ELISA. (**p<0,001)

^b The limit of sensitivity of the IFN- γ test was 31,3 pg/ml.

3.3.4.3- *Ceacam1a*^{-/-} NK cells do not promote the synergistic IFN- γ production in the presence of IL-12 and IL-18

To verify if the production of IFN- γ by L2-MHV3-infected NK cells, treated with IL-12 and IL-18, results from the viral replication in NK cells, cells from knock-out mice for CEACAM1a cell surface molecules (the specific MHV receptor) were compared with those from wild type C57BL/6 mice. Myeloid MNCs from wild type and *Ceacam1a*^{-/-} C57BL/6 mice were infected *in vitro* with the L2-MHV3 virus for 24 hrs in the presence of rIL-12/rIL-18. The IFN- γ levels in supernatants were further quantified. Results revealed that no IFN- γ was induced by myeloid MNC cells from *Ceacam1a*^{-/-} mice when treated with rIL12/rIL-18 infected or not with the L2-MHV3 virus (Table VIII). In addition, no viral proteins were also detected in myeloid NK cells from *Ceacam1a*^{-/-} mice following a double immunolabelling using anti-DX5 and anti-MHV3 antibodies, indicating that no viral replication occurred in these cells.

Table VIII. Production of IFN- γ at 24 hrs p.i. in L2-MHV3-infected myeloid MNCs from wild type and *Ceacam1a*^{-/-} C57BL/6 mice in the absence or presence of rIL-12/rIL-18

| Myeloid cells ^a | Interferon (IFN)- γ (pg/ml) | | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|---------|---------------|----------------------------|
| | Control | L2-MHV3 | rIL-12/rIL-18 | L2-MHV3 + rIL-12/rIL-18 |
| <i>Ceacam1a</i> ^{+/+} mice | < 31,3 ^b | < 31,3 | < 31,3 | 799 \pm 253*** |
| <i>Ceacam1a</i> ^{-/-} mice | < 31,3 | < 31,3 | < 31,3 | < 31,3 |

^a Myeloid MNCs were obtained from wild type or *Ceacam1a*^{-/-} C57BL/6 mice and infected with the L2-MHV3 virus in the presence of rIL-12/rIL-18 for 24 hrs. The IFN- γ levels were quantified in supernatants by ELISA. (***)p<0,001)

^b The limit of sensitivity of the IFN- γ test was 31,3 pg/ml.

3.3.4.4- Viral replication is essential to promote the synergistic IFN- γ production in NK cells

The failure in IFN- γ production by *Ceacam1a*^{-/-} cells suggests that viral replication is essential for this response. This hypothesis was then verified using UV-treated viruses. Myeloid MNCs from wild type C57BL/6 mice were infected with infectious or UV-treated L2-MHV3 viruses in the presence of rIL-12/rIL-18. IFN- γ levels were thereafter determined in supernatants at 24 hrs p.i. As shown in Figure 17, production of IFN- γ strongly decreased when UV-treated L2-MHV3 viruses were added to cells in the presence of rIL-12/rIL-18 (p<0,001). The absence of viral translation in myeloid NK cells infected with the UV-treated viruses was also confirmed by a double

immunolabelling using anti-DX5 and anti-MHV3 antibodies, since no intracellular viral proteins were thus detected.

However, when bone marrow MNCs were treated with rIL-12/rIL-18 for 2 hrs prior to infection with the L2-MHV3 virus, the synergistic IFN- γ production failed to occur (data not shown), indicating that the cellular signaling pathway(s) involved in this response may be simultaneously activated by cytokines and the first steps of viral replication.

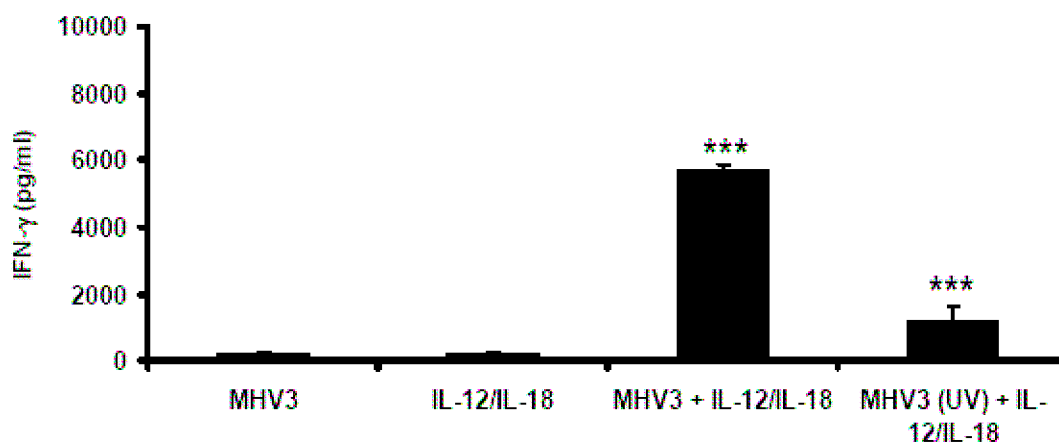


Figure 17. Production of IFN- γ at 24 hrs p.i. in *in vitro* myeloid MNCs from C57BL/6 mice infected with infectious L2-MHV3 viruses or UV-treated L2-MHV3 viruses in the presence of rIL-12/rIL-18 at 24 hrs p.i. The IFN- γ levels were quantified in supernatants by ELISA. (***) $p < 0.001$)

3.3.4.5- Inhibitory role of CEACAM1a in the IFN- γ production in the presence of MHV3

It is known that cross-linking or homotypic interactions between CEACAM1a are essential to induce an inhibitory response in NK or NK-T cells (Markel *et al.*, 2002a; Markel *et al.*, 2002b). We thus studied if the cross-linking of the anti-CEACAM1a mAb

(AgB10) could provide this effect. We had verified before that the specific antibody AgB10 did not induce by itself the synergistic IFN- γ production in the presence of rIL-12/rIL-18 (results not shown). Then, AgB10 was coated on 24-well plates during 2 hrs after which myeloid MNCs from wild type C57BL/6 were seeded and infected with the L2-MHV3 virus in the presence of rIL-12/rIL-18. The IFN- γ levels were then quantified after 24 hrs p.i. As shown in Figure 18A, the synergistic IFN- γ production was then inhibited by coated AgB10, suggesting that cross-linking of CEACAM1a can down-regulate the synergistic response induced by the L2-MHV3 virus in the presence of IL-12/IL-18 or compete with the viral fixation to the CEACAM1a receptor ($p < 0,05$ when compared to L2-MHV3 treated with rIL-12/rIL-18).

To further support the hypothesis of the engagement of CEACAM1a in the down-regulation of the IFN- γ response, bone marrow MNCs from wild type C57BL/6 mice were treated with different concentrations of a SHP-1 phosphatase inhibitor (SS), which is involved in the inhibitory signaling pathway of CEACAM1a (Chen *et al.*, 2001), but not in viral replication, prior to the infection with the L2-MHV3 virus in the presence of rIL-12/rIL-18. The IFN- γ levels were thereafter quantified after 24 hrs p.i. As shown in the Figure 18B, production of IFN- γ increased when myeloid cells were treated with the SHP-1 phosphatase inhibitor at concentrations ranging from 10-100 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,01$ at 10 $\mu\text{g/ml}$ and 100 $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,05$ at 50 $\mu\text{g/ml}$). This result supports the inhibitory role of CEACAM1a rather than neutralization of viral fixation.

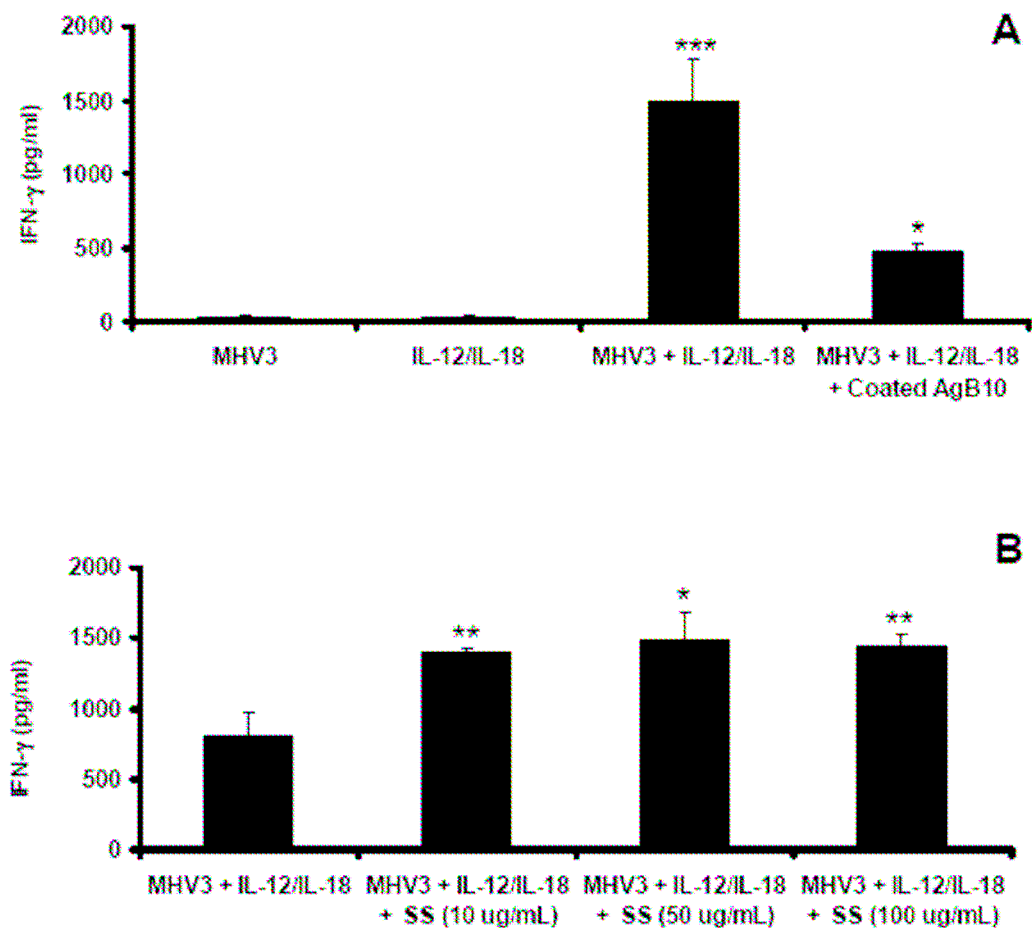


Figure 18. Production of IFN- γ in *in vitro* L2-MHV3-infected myeloid MNCs from C57BL/6 mice in the presence of rIL-12/rIL-18, pre-treated or not with 2 μ g of coated AgB10 (A). Production of IFN- γ in *in vitro* L2-MHV3-infected myeloid MNCs from C57BL/6 mice in the presence of rIL-12/rIL-18, pre-treated or not with different concentrations of SS (B). The IFN- γ levels were quantified in supernatants by ELISA. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

3.3.4.6- The p38 MAPK pathway is involved in the synergistic IFN- γ production in NK cells

The p38 and ERK-1/2 MAPK pathways are mainly involved in the production of IFN- γ by NK cells when stimulated by IL-12 and IL-18 (Mavropoulos *et al.*, 2005; Ortaldo *et al.*, 2006). Moreover, early steps of MHV replication also depend on activation of the p38 and ERK-1/2 MAPK pathways (McGilvray *et al.*, 1998; Banerjee *et al.*, 2002), whereas CEACAM1a engagement predominantly induces the ERK-1/2 MAPK pathway (Yu *et al.*, 2006). We have thus verified if the IFN- γ response depended on the p38 and/or ERK-1/2 MAPK pathways. Total bone marrow MNCs and purified DX5⁺ cells (96% purity) from wild type C57BL/6 mice were treated 2 hrs with specific inhibitors of p38 (SB203580) and ERK-1/2 (U0126) MAPK and thereafter infected with the L2-MHV3 virus in the presence of rIL-12 and rIL-18. The IFN- γ levels were then quantified after 24 hrs p.i. As shown in Table IX, production of IFN- γ by L2-MHV3-infected total bone marrow MNCs treated with rIL-12 and rIL-18 significantly decreased in the presence of the p38 MAPK inhibitor ($p < 0,001$), when compared to L2-MHV3-infected cells treated only with the cytokines. Such effect was conserved in the purified myeloid DX5⁺ cell fraction ($p < 0,001$ for the p38 MAPK inhibitor). The ERK-1/2 MAPK inhibitor did not induce any effect.

Table IX. Production of IFN- γ at 24 hrs p.i. in rIL-12/rIL-18-treated and L2-MHV3-infected total myeloid cells or purified DX5⁺ cells from wild type C57BL/6 mice in the presence of the p38 MAPK (SB203580) or ERK-1/2 MAPK (U0126) inhibitors.

| | Interferon (IFN)- γ (pg/ml) | | | |
|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------|--|---------------------------------------|
| | rIL-12/rIL-18 | L2-MHV3 + rIL-12/rIL-18 | L2-MHV3 + rIL-12/rIL-18 + SB203580 | L2-MHV3 + rIL-12/rIL-18 + U0126 |
| Myeloid cells^a | | | | |
| Total cells | < 31,3 ^b | 799 \pm 253*** | 79 \pm 42*** | 577 \pm 254 |
| Purified DX5 cells | 646 \pm 99 | 1664 \pm 277*** | 504 \pm 99*** | 1361 \pm 84 |

^a Myeloid MNCs were obtained from wild type C57BL/6 mice and treated 2 hrs with the p38 MAPK (SB203580) or ERK-1/2 MAPK (U0126) inhibitors. The myeloid MNCs were then infected with the L2-MHV3 virus and treated with rIL-12/rIL-18. Purified DX5⁺ cells from C57BL/6 mice were obtained by treatment of total myeloid MNCs with the CD49b (DX5 or Pan NK) mab coupled to microbeads (96% purity in the purified fraction). The IFN- γ levels were quantified in supernatants by ELISA. (***p<0,001)

^b The limit of sensitivity of the IFN- γ test was 31,3 pg/ml.

3.3.4.7- IL-12, IL-18 and IFN- γ production decrease in liver from L2-MHV3-infected C57BL/6 mice

To verify if the synergistic production of IFN- γ by NK cells, induced by both viral infection and IL-12/IL-18, may occur in the liver of L2-MHV3-infected mice, the intrahepatic IFN- γ level was then evaluated in liver extracts from groups of six C57BL/6

mice infected with 1000 TCID₅₀ of the L2-MHV3 virus. As shown in Figure 19A, the IFN- γ production was strongly impaired in livers from L2-MHV3- infected mice at 72 hrs p.i. ($p < 0,001$) when compared to mock-infected mice. As IL-12 and IL-18 are normally produced in liver by KC and LSEC, which are also important target cells for L2-MHV3 (Martin *et al.*, 1994; Gerdes *et al.*, 2002; Leifeld *et al.*, 2002), it is hypothesized that the low level of intrahepatic IFN- γ results from the deprivation of intrahepatic IL-12 and IL-18, resulting from viral infection of these cells. This hypothesis was verified through the determination of intrahepatic IL-12 and IL-18 levels in L2-MHV3-infected mice at 72 hrs p.i. As shown in Figure 19B, the levels of intrahepatic IL-12 were impaired in L2-MHV3-infected mice after three days of infection compared to the basal levels of mock-infected mice ($p < 0,001$). Moreover, intrahepatic IL-18 also decreased in L2-MHV3-infected mice during the acute hepatitis ($p < 0,001$) (Fig. 19C). Such drops occurred as early as 24 hrs p.i. (results not shown), but the cytokines reached their minimal levels at 72 hrs p.i.

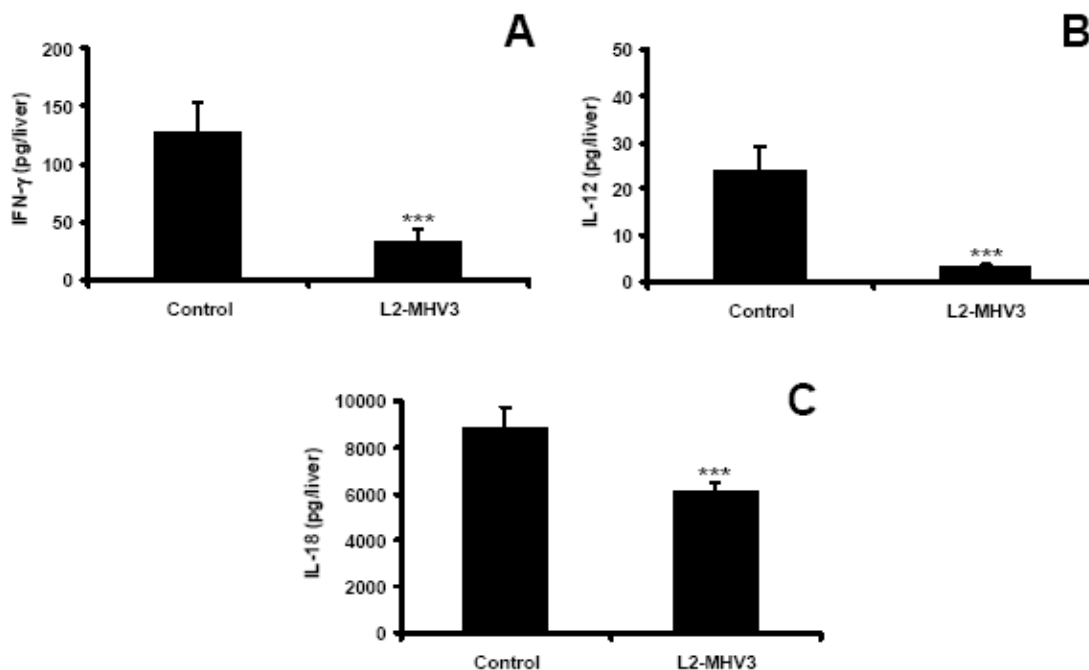


Figure 19. Production of intrahepatic IFN- γ (A), IL-12 (B) and IL-18 (C) in liver extracts from mock- and L2-MHV3-infected C57BL/6 mice at 72 hrs p.i. Six mice were used in each experimental group. The cytokine levels were quantified by ELISA. (***)p<0,001)

3.3.4.8- Apoptosis of intrahepatic NK1.1⁺ β TCR⁻ cells during the acute viral hepatitis

To determine if the loss of IFN- γ production by intrahepatic NK cells during the acute phase of the viral hepatitis also results from the virus-induced apoptosis, as suggested by the *ex vivo* observations, groups of three C57BL/6 mice were infected with 1000 TCID₅₀ of the L2-MHV3 virus and intrahepatic MNCs were thereafter isolated at different times p.i. Intrahepatic MNCs were then labelled with FITC-anti-NK1.1 and PE-anti- β TCR antibodies and analyzed by fluorocytometry. Two distinct cell populations were observed according to the FSC/SSC parameters. Normal lymphoid cells were characterized by normal FSC and SSC parameters (TUNEL⁺ <10.0 \pm 2.4%),

whereas apoptotic lymphoid cells, characterized by lower FSC and higher SSC parameters, were confirmed by a TUNEL test ($97.0 \pm 3.0\%$ positive cells) (Jacques *et al.*, 2008). As shown in the Figure 20A, the NK1.1⁺βTCR⁻ cell subset from the intrahepatic MNCs increased in the livers from L2-MHV3-infected mice, at 36 to 48 hrs p.i. when compared to mock-infected mice ($p < 0,001$ for 36 hrs p.i. and $p < 0,01$ for 48 hrs p.i.). However, intrahepatic NK1.1⁺βTCR⁻ cells from L2-MHV3-infected mice became apoptotic starting from 36 hrs p.i. and peaking at 48 hrs p.i. ($p < 0,01$ for 36 and 72 hrs p.i.; $p < 0,001$ for 48 hrs p.i.) (Fig. 20B).

The strong apoptosis of intrahepatic NK cells after 72 hrs of infection may thus support the inability of intrahepatic NK cells to respond to IL-12/IL-18 in the synergistic IFN-γ production, as observed after the *ex vivo* treatment.

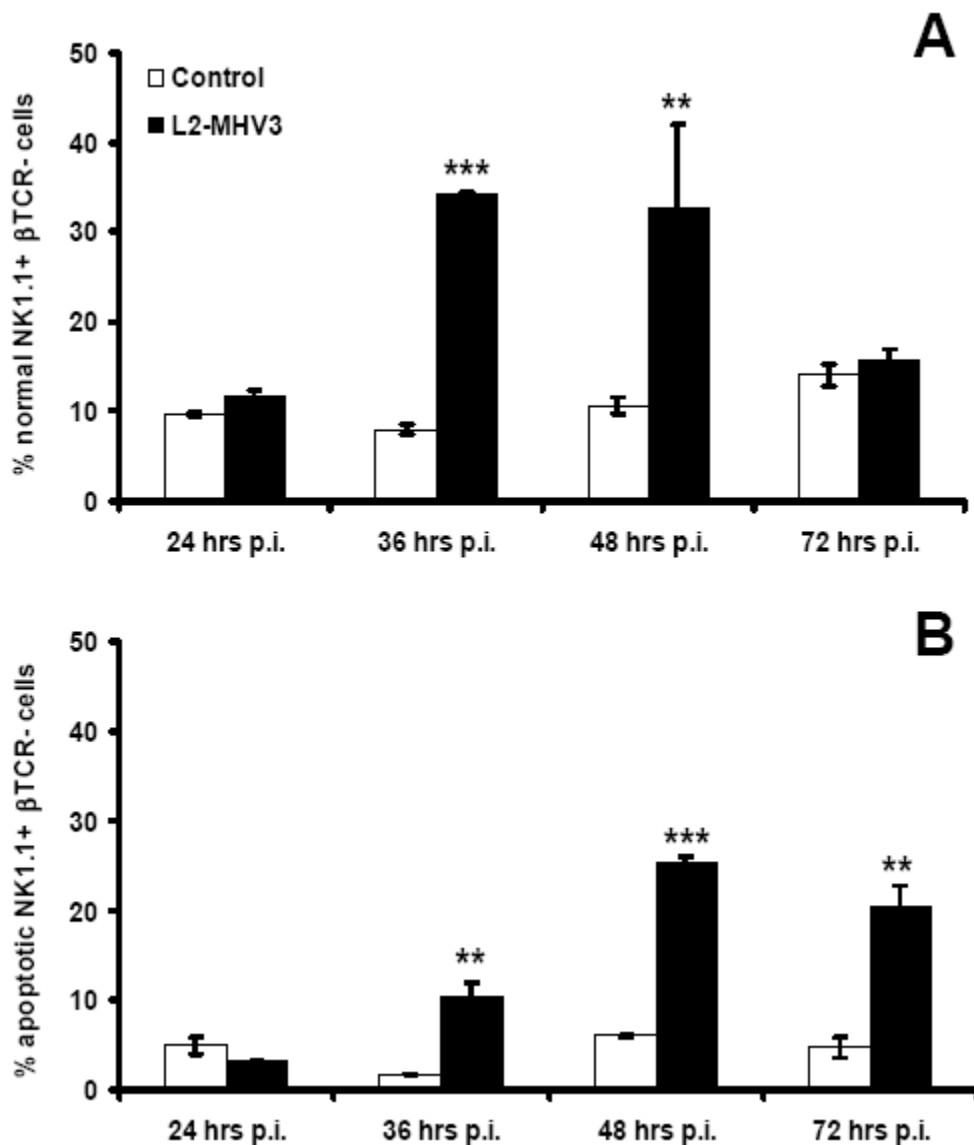


Figure 20. Normal (A) and apoptotic (B) intrahepatic NK1.1⁺βTCR⁻ cells in mock- and L2-MHV3-infected C57BL/6 mice at various times p.i. Three mice were used in each experimental group. Intrahepatic NK1.1⁺βTCR⁻ cells were analyzed using a FACScan flow cytometer and a total of 10,000 events were recorded. (**p<0,01, ***p<0,001)

* Some results of this experiment were partially used on a previous study (Jacques *et al.*, 2008) to decrease the number of mice according to the directives from CIPA.

3.3.5- Discussion

In this study, we report that the L2-MHV3 virus, in the presence of IL-12 and IL-18, induce a synergistic IFN- γ production by NK cells from *Ceacam1a*^{+/+} mice. This effect was shown to be dependent on viral replication, and was under control of the p38 MAPK but not the ERK-1/2 MAPK signaling pathway. However, the signal triggered through the engagement of CEACAM1a inhibits the synergistic production of IFN- γ .

For induction of an efficient antiviral response by recruited NK cells, the intrahepatic micro-environment must be adequate to activate them. Hepatic NK cells normally colocalize at sites expressing viral antigen and IFN- γ during infection (Salazar-Mather *et al.*, 1998). This environment may allow NK cells to receive cell-to-cell or cell-to-matrix contact signals that favour an IL-12-dependent IFN- γ secretion, as NK cells are differently activated by IL-18 regarding to their localization (Pien *et al.*, 2000). Hepatic NK cells also exert their functions in a tolerant environment and indeed, immunosuppressive cytokines such as TGF- β and IL-10 determine the levels of IFN- γ inhibition (Schroder *et al.*, 2003). However, we have recently observed that these immunosuppressive cytokines decrease in the liver from L2-MHV3-infected mice but not in mice infected with attenuated variants (Jacques *et al.*, 2008).

In this work, we have demonstrated that the MHV3 virus can induce a synergistic IFN- γ response, both in intrahepatic and myeloid MNCs cells, in the presence of IL-12/IL-18. This property was mainly due to NK (DX5⁺) cells, since it was lost when NK cells were depleted, whereas purified NK cells exhibit this synergistic IFN- γ response. It was important to demonstrate the role of NK cells in the production of IFN- γ , since CD8⁺ T cells, or NK-T cells, which are also present in the liver and/or the bone marrow, can be other sources for IFN- γ in response to IL-12/IL-18 treatment (Papadakis *et al.*, 2004; Uchida *et al.*, 2007). However, neither CD4⁺ nor CD8⁺ T cells expressed CEACAM1a, or have very low levels of expression (Godfraind et Coutelier, 1998), and can be infected by the L2-MHV3 virus (Lamontagne et Jolicoeur, 1994). On the other

hand, B cells, which may be infected by the MHV3 virus (Jolicoeur et Lamontagne, 1989), are not known to be IFN- γ -producing cells.

We have previously reported that NK cells are a new cell target for the MHV virus (Lehoux *et al.*, 2004). These cells can express the viral CEACAM1 receptor (Stern *et al.*, 2005). In this context, the synergistic production of IFN- γ by NK cells in the presence of a coronavirus requires CEACAM1a. Effectively, NK cells from *Ceacam1a*^{-/-} mice do not produce IFN- γ in a synergistic manner in response to IL-12/IL-18 and the L2-MHV3 virus. The absence of a synergistic response of cells from *Ceacam1a*^{-/-} mice did not result from NK cells functional anomalies, since no significant differences in the intrahepatic lymphoid cell subpopulation, nor in NK cell functions have been observed in cells from *Ceacam1a*^{-/-} mice when compared to wild-type C57BL/6 mice. Moreover, no maturation defects of NK cells have been detected in the bone marrow of *Ceacam1a*^{-/-} mice compared to wild type C57BL/6 mice (unpublished observations from Dr. Beauchemin team). However, our results suggest that the L2-MHV3 virus may induce this synergistic IFN- γ production independently of CEACAM1a, but requires this molecule to enter into NK cells. This hypothesis is also supported by the involvement of viral replication rather than the viral fixation, as demonstrated by the use of UV-inactivated MHV3 viruses and the p38 MAPK inhibitor.

In addition, CEACAM1a receptor does not directly trigger the production of IFN- γ by NK cells, as the addition of a specific anti-CEACAM1a antibody (AgB10) did not induce production of this cytokine. AgB10 binds an area between the first and second Ig domains of the CEACAM1a (Daniels *et al.*, 1996; Hemmila *et al.*, 2004). However, experiments using plate bounded with anti-CEACAM1a AgB10 antibodies, or the SHP-1 inhibitor, revealed that engagement of CEACAM1a receptors may activate the SHP-1 signaling pathway, which in turn leads to the inhibition of IFN- γ production by NK cells in the presence of the L2-MHV3 virus.

The CEACAM1a receptor exists under two isoforms constituted either of a long inhibiting cytoplasmic domain, which contains ITIMs motifs, or a short activating cytoplasmic domain, which does not possess ITIMs or ITAMs motifs (Beauchemin *et*

al., 1999). Ortaldo and Young (2003) have recently demonstrated that IL-12 and IL-18 override the inhibitory mechanisms of the Ly-49 inhibitory receptors containing ITIMs motifs, thus enabling IFN- γ production. These authors nevertheless noticed that cross-linking of activating Ly49 receptors which possess ITAMs motifs is essential to respond to IL-12 and IL-18. CEACAM1a receptor has already been associated with the inhibition of the IFN- γ production by human NK-T cells (Markel *et al.*, 2002b). In our study, CEACAM1a may play an inhibitory role, by cross-linking or homotypic interactions, in the IFN- γ production by NK cells. On the other hand, inhibition of SHP-1, which is associated to ITIMs motifs (Chen *et al.*, 2001), increased the production of this cytokine. We thus speculate that CEACAM1a is involved in the modulation of an IL-12/IL-18-dependent IFN- γ pathway in NK cells. The high number of viral S proteins produced by MHV3 infected hepatic cells may bind to CEACAM1a molecules expressed at the NK cell surface attenuating thus the secretion of IFN- γ .

Our results indicate that the synergistic response of IFN- γ in L2-MHV3-infected NK cells, in the presence of rIL-12 and rIL-18, is completely dependent on the p38 but not the ERK-1/2 MAPK pathway. The p38 MAPK pathway thus links the viral infection in the NK cells activation mediated by rIL-12 and rIL-18. The production of IFN- γ by NK cells stimulated with IL-12 and/or IL-18 is dependent on activation of ITAMs and regulated through p38 and ERK-1/2 MAPK pathways (Mavropoulos *et al.*, 2005; Ortaldo *et al.*, 2006). A pre-treatment of NK cells with IL-12 during 15 minutes is sufficient for IFN- γ induction (Ortaldo *et al.*, 2006). Simultaneously, the p38 MAPK pathway is essential for the first steps of MHV replication (Banerjee *et al.*, 2002), whereas the ERK-1/2 MAPK pathway is predominantly activated by CEACAM1a (Yu *et al.*, 2006). We have observed that UV-inactivated L2-MHV3 viruses failed to induce IFN- γ production when compared to infectious L2-MHV3 viruses, indicating that a RNA-dependent phase of the viral replication rather than viral fixation to CEACAM1a receptor is involved in the synergistic IFN- γ production.

We have observed that the no synergistic IFN- γ production was observed between the L2-MHV3 virus and rIL-12/rIL-18 when added at an interval of 2 hrs p.i.

This result reinforces the implication of an early stage in the viral replication for the synergistic production of the IFN- γ by NK cells. Recently, Barr *et al.* (2007) have reported a rapid and transient activation of NK cells and IFN- γ production following infection with herpes simplex virus type 1 resulting from release of IL-18 by dendritic cells. We cannot exclude the possibility that the loss of the synergistic production of IFN- γ when NK cells were pre-treated with rIL-12/rIL-18 for 2 hrs prior to infection with the L2-MHV3 virus may be consequent to impaired expression of CEACAM1a. Indeed, IFN- γ reduces the expression of CEACAM1a, as reported by Vassao *et al.* (2000). Thus, NK cells may become resistant to a subsequent fixation of the MHV3 virus, which in turn would affect IFN- γ production. All together, these data suggest that NK cells from the bone marrow and the spleen are more prompt to produce a synergistic IFN- γ production cells during the *in vitro* MHV3 infection in the presence of IL-12/IL-18.

During the acute phase of viral infection, recruitment of NK cells from the bone marrow or spleen to the affected organ is generally observed (Wang *et al.*, 2005). Several studies have demonstrated that myeloid or splenic NK cells are essential during the acute hepatitis, as these cells determined the antiviral protection (Stohlman *et al.*, 1983; Bukowski *et al.*, 1984; Lehoux *et al.*, 2004; Jacques *et al.*, 2008). However, recruited NK cells in liver require activation by adequate levels of IL-12 and IL-18 to become highly producers of IFN- γ . We have observed that these cytokines rapidly decreased in liver from L2-MHV3 infected mice, impairing the efficient activation the newly-recruited NK cells. Stohlman *et al.* (1983) have already observed that recruited NK cells in the liver of MHV JHM-infected mice were not able to produce IFN- γ even they still exerted cytotoxic activities. It is known that KC produce IL-12 and IL-18 following various stimuli which may further activate intrahepatic NK and NK-T cells to produce IFN- γ (Seki *et al.*, 2000). However, these cells are also permissive to viral replication and subsequent cell lysis (Martin *et al.*, 1994), explaining thus the decrease in the production of IL-12 and IL-18 in L2-MHV3-infected mice. The results that we have provided are in agreement with a previous *in vivo* study, reporting that treatment

with rIL-12 and rIL-18 to susceptible mice creates an anti-MHV3 state by significantly increasing IFN- γ production (Moreira *et al.*, 2004).

We have recently demonstrated that level of hepatitis and apoptosis of NK cells in mice infected with the L2-MHV3 virus depend on viral permissivity of KC and LSEC to MHV3 replication (Jacques *et al.*, 2008). Viral infection of KC may alter the recruitment of NK cells and these NK cells may become infected when in contact with infected LSEC. Recruited NK cells became apoptotic as early as 48 hrs p.i. in the liver of L2-MHV3-infected mice and, as IL-12, IL-18 and IFN- γ responses are impaired. It suggests that these pro-inflammatory cytokines may be essential, not only to preserve the antiviral functions of NK cells, but also to favour the survival of NK1.1 cells recruited to the liver. The increase in apoptotic NK cells in the liver from L2-MHV3-infected mice after 48 hrs p.i. can also explain the inability of these cells to produce IFN- γ . However, the viral-induced apoptosis is not probably involved, since the synergistic production of IFN- γ occurred during the first steps of viral replication, whereas the viral-induced apoptosis occurred rather after the translation of viral mRNAs. Effectively, viral-induced apoptosis depends on synthesis of the viral E protein that occurs at the end of the viral replication cycle (An *et al.*, 1999). It is postulate thus that decrease of IL-12 and IL-18 in liver from L2-MHV3-infected mice favour the NK cell apoptosis by cytokine deprivation.

Further work is in progress to identify the step of viral replication involved in the synergistic IFN- γ production by NK cells and the role of L2-MHV3-infected hepatocytes, KC and LSEC in the impairment of this synergistic response.

3.3.6- Acknowledgements

The authors thank Dr. Tatiana Scorza (Université du Québec à Montréal) for revising this manuscript and her critical comments. A. J. was supported by a NSERC fellowship. This work was supported by a grant from NSERC-Canada (LL) and the

Canadian Institutes of Health Research (NB). A. Jacques was supported by a NSERC fellowship from the government of Canada.

3.4- Article 4

L'objectif de cet article était de démontrer le mécanisme par lequel des cellules macrophagiques sont en mesure de produire des cytokines inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- α au cours de l'hépatite aiguë induite chez la souris susceptible C57BL/6 par le virus pathogène L2-MHV3. L'originalité de cet article a été l'utilisation de souris *Ceacam1a*^{-/-} et *Tlr2*^{-/-} dans l'étude des mécanismes régulant la production de ces cytokines inflammatoires chez des cellules macrophagiques. Par ailleurs, cet article met en évidence le fait que la réplication du virus MHV3 et sa fixation au récepteur CEACAM1a ne sont pas nécessaires à l'établissement d'une réponse inflammatoire, mais que cette réponse est plutôt induite par la liaison de la protéine de surface à la molécule TLR2 au niveau de régions membranaires riches en héparanes sulfates. En fait, cette étude suggère un nouveau mécanisme par lequel un virus enveloppé peut induire une réponse inflammatoire indépendamment de sa réplication et où les particules défectives pourraient potentiellement être impliquées dans ce phénomène d'amplification de la réponse immunitaire. De plus, cet article montre pour la première fois que la présence de la molécule TLR2 joue un rôle crucial dans le développement de la pathologie induite par un coronavirus.

Mon rôle dans cet article a été d'effectuer toutes les expériences présentées dans cet article, de procéder à l'analyse de tous les résultats et de participer à la rédaction complète de l'article, en collaboration avec ma directrice de recherche.

MACROPHAGE IL-6 AND TNF- α ARE INDUCED BY CORONAVIRUS
FIXATION TO TLR2/HEPARAN SULFATE RECEPTORS BUT NOT CEACAM1a

A. JACQUES, C. BLEAU, C. TURBIDE, N. BEAUCHEMIN & L. LAMONTAGNE

Département de microbiologie et d'immunologie

Université de Montréal, Canada

Accepté à la revue *Immunology*

----- Original Message -----

Subject: Immunology - IMM-2008-1053.R1

Date: Thu, 7 Aug 2008 08:08:53 -0400 (EDT)

From:

To:

Dear Authors

Macrophage IL-6 and TNF-a are induced by coronavirus fixation to TLR2/heparan sulfate receptors but not CEACAM1a

RE: Authors: LAMONTAGNE, LUCIE; Jacques, Alexandre; Bleau, Christian; Turbide, Claire; Beauchemin, Nicole

Manuscript ID: IMM-2008-1053.R1

Thank you for submitting the above-mentioned manuscript to Immunology. I am pleased to say that your revised paper has now been accepted for publication. The proofs will follow from the publishers.

The proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Please contact the production editor

Fax:

E-mail:

if this is a problem. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site:

This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs as they should be dealt with promptly and accurately.

If you have any queries please do not hesitate to contact the editorial office.

Yours sincerely
Sharon Tobin

on behalf of Prof. Klaus Heeg

'Immunology' is an official journal of the British Society for Immunology, registered charity 1043255 and registered in England and Wales as company 3005933, and is published by Blackwell Publishing.

3.4.1- Abstract

A rapid antiviral immune response may be related to virus-cell interaction with the host-cell leading to activation of macrophages via pattern recognition receptors (PPRs) or specific viral receptors. The carcinoembryonic cell adhesion antigen 1a (CEACAM1a) is the specific receptor for the mouse hepatitis virus (MHV), a coronavirus, known to induce acute viral hepatitis in mice. The objective of this study was to understand the mechanisms responsible for the secretion of high pathogenic MHV3-induced inflammatory cytokines. We report that the induction of pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α in peritoneal macrophages does not depend on CEACAM1a, as demonstrated in cells isolated from *Ceacam1a*^{-/-} mice. Induction of IL-6 and TNF- α production was rather related to the fixation of MHV3's S protein on toll-like receptor 2 (TLR2) in regions enriched in heparan sulfate instead of relying on viral replication, as demonstrated with denatured S proteins and UV-inactivated viruses. High levels of IL-6 and TNF- α were produced in livers from infected C57BL/6 mice but not in livers from *Tlr2*^{-/-} mice. The histopathologic observations were correlated with the levels of inflammatory cytokines. The viral fixation to heparan sulfate/TLR2 differently triggers activation of the p38 MAPK and NF- κ B pathways according to mouse strain and activated cytokines. These results suggest that TLR2 and heparan sulfate receptors can act as new viral PPR involved in inflammatory responses.

3.4.2- Introduction

The ability of innate immune mechanisms to respond to viral infection plays a major role in the survival of the host. The first step of a viral infection is the fixation of virus to a specific receptor exposed on target cells. However, some viruses can use surface molecules involved in innate defence mechanisms as nonspecific receptors. These molecules are located on macrophages or lymphocytes and may modify their antiviral functions (Crotta *et al.*, 2002; Kelly *et al.*, 2008).

Rapid antiviral immune response may be related to virus interactions with host-cells leading to activation of macrophages via pattern recognition receptors (PPRs) (Medzhitov et Janeway Jr, 2002). Although many PPRs have been identified for bacteria, few PPRs are known for viruses on macrophages. Toll-like receptors (TLR), helicases RIG-1, MDA5 or PKR (dsRNA dependent protein kinase) are known to be engaged following certain types of viral infections and to initiate the production of pro-inflammatory cytokines, chemokines and interferons- α/β (Unterholzner et Bowie, 2008).

The occurrence of a new respiratory disease, the severe acute respiratory syndrome (SARS), inducing a robust pulmonary inflammation has raised the possibility that some viral components may stimulate the production of inflammatory cytokines by macrophages. Wang *et al.* (2007) have demonstrated that a surface viral protein from the SARS virus directly stimulated the production of tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-6 (Tseng *et al.*, 2005b). The induction of macrophage inflammatory cytokines by viral surface proteins has been occasionally observed with other viruses, such as feline infectious peritonitis virus or Epstein-Barr virus (D'Addario *et al.*, 2000; Takano *et al.*, 2007).

The mechanisms triggered by coronaviruses in the induction of the inflammatory response by macrophages are not known. Mouse hepatitis virus type 3 (MHV3), a coronavirus, induces a rapid acute hepatitis characterized by the death of susceptible C57BL/6 mice within 3 to 5 days post-infection (Le Prevost *et al.*, 1975; Dupuy *et al.*, 1975; Levy-Leblond *et al.*, 1979). Histopathological studies revealed an extensive necrosis with inflammatory perivascular foci and impairment of immunosuppressive cytokines such as IL-4, IL-10, PGE₂ and TGF- β (Martin *et al.*, 1994; Jacques *et al.*, 2008).

Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecules 1 (CEACAM1), previously known as biliary glycoproteins, are members of the immunoglobulin superfamily (Beauchemin *et al.*, 1999). Murine CEACAM1 proteins are mostly present in the liver and intestine and act as receptors for different bacterial or viral pathogens including MHV (Dveksler *et al.*, 1991; Leusch *et al.*, 1991). This observation was supported by

the fact that C57BL/6 mice knock-out for the *Ceacam1a* gene are completely resistant to MHV-A59 infection (Hemmila *et al.*, 2004).

CEACAM1a promotes different functions such as cellular adhesion, signalling, tumor suppression and angiogenesis (Beauchemin *et al.*, 1999). Activation of carcinoembryonic antigen (CEA) induces the secretion of IL-1 α , IL-6 and TNF- α by Kupffer cells and then promotes the establishment of hepatic metastasis (Edmiston *et al.*, 1997). Furthermore, it was demonstrated that production of IL-1 α and TNF- α by Kupffer cells, via the activation of CEA, involved tyrosine phosphorylation (Gangopadhyay *et al.*, 1997). In addition, the signalling pathway implicated in CEA-activated cells seemed to be different than the pathway involved in LPS-activated Kupffer cells (Gangopadhyay *et al.*, 1997). It has been reported that stimulation of CEACAM1a on PC12 cells by antibodies induced a rapid and transient CEACAM1a tyrosine dephosphorylation involved in the downstream activation of the extracellular signal-related kinase (ERK)-1 and ERK-2 but not Jun N-terminal kinase (JNK) or p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Budt *et al.*, 2002). In contrast, the replication of MHV3 in peritoneal macrophages involved the activation of the p38 and the ERK-1/2 MAPK in less than 30 min, suggesting that cellular activation was due to viral fixation to a receptor (McGilvray *et al.*, 1998).

However, de Haan *et al.* (2005) have demonstrated that some murine coronavirus variants generated by *in vitro* cultures expressed an extended host range and also used heparan sulfate binding sites as an entry receptor instead of using the specific CEACAM1a receptor. Recently, Watanabe *et al.* (2007) have observed that another serotype, the MHV-JHM virus, can interact with heparan sulfate, but this receptor cannot allow the internalization of this virus.

It was demonstrated that few viral proteins such as hepatitis B virus (HBV)'s capsid, hepatitis C virus (HCV)'s core, or herpesvirus (HSV) glycoproteins may induce pro-inflammatory cytokines via the activation of TLR2 associated or not with membranes enriched in heparan sulphate (Compton *et al.*, 2003; Dolgianuc *et al.*, 2004; Kurt-Jones *et al.*, 2004; Cooper *et al.*, 2005). The recognition by TLRs of pathogen-

associated molecular patterns (PAMPs) triggers the TIR-domain-dependent association with adapters, such as MyD88 and TIRAP, recruiting the IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) and following their phosphorylation, activates other factors involved in the activation of the transcription factor NF- κ B. The NF- κ B activation by this pathway results in the expression of inflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α (Kawai et Akira, 2005). Moreover, during chronic HCV infections, the serum IL-6 levels correlate with the viral load and the length of the infection (Oyanagi *et al.*, 1999), whereas TNF- α levels increase the hepatic cellular apoptosis (Vidigal *et al.*, 2002; Lio *et al.*, 2003). The *in vivo* relevance of this observation may be related to the expression of TLRs in liver injury and the inflammatory state of chronically HCV-infected patients (Riordan *et al.*, 2006), but mechanisms involved have not yet been elucidated.

The respective roles of CEACAM1a, the coronavirus receptor, TLR2, heparan sulfate binding sites, as well as other unspecific viral PPRs, in the induction of the inflammatory responses seen in human or murine coronaviruses acute infection have not been yet determined.

In this study, we demonstrate that production of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α by MHV3-infected peritoneal macrophages is induced by fixation of the MHV3's protein S on TLR2 associated with regions enriched of heparan sulfate instead of CEACAM1a. Furthermore, the release of IL-6 and TNF- α is mostly dependent on the activation of the ERK-1/2 MAPK and JNK pathways and, to a lesser extent, of the p38 MAPK and NF- κ B pathway. The pathology induced by the L2-MHV3 virus is related to the release of intrahepatic IL-6 and TNF- α via the TLR2 receptor, as demonstrated in *Tlr2*^{-/-} mice and by histopathologic observations.

3.4.3- Materials and methods

3.4.3.1- Mice

C57BL/6 (*Ceacam1a*^{+/+}) and SJL (*Ceacam1b*^{+/+}) mice were purchased from Charles River Laboratories (St-Constant, Qc, Canada), whereas *Tlr2* knock-out mice

(B6.129-*Tlr2*^{tm1Kir}/J) were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, MA, USA). C57BL/6 *Ceacam1a* knock-out (*Ceacam1a*^{-/-}) mice were generated by Dr. N. Beauchemin, as previously described (Leung *et al.*, 2006). The animals, certified as MHV3-free by the manufacturer, were housed under HEPA-filtered air (Forma Scientific, Marietta, OH). Female mice between 8 and 12 weeks of age were used in all experiments. The study was conducted in compliance with the regulations from the Animal Committee of the Université du Québec à Montréal (UQAM).

3.4.3.2- Viruses

The pathogenic L2-MHV3 is a cloned substrain isolated from the liver of infected DBA2 mice and was produced in L2 cells as previously described (Dupuy et Rodrigue, 1981). Pathogenic properties of the L2-MHV3 virus were assessed regularly.

3.4.3.3- *In vivo* viral infection

Groups of four C57BL/6 and *Tlr2*^{-/-} mice were infected by the intraperitoneal (i.p.) route with 1000 TCID₅₀ of L2-MHV3 virus. Mock-infected mice received a similar volume of RPMI 1640 (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY, USA). At 96 hrs post-infection (p.i.), the mice were anesthetized by i.p. injection using ketamine hydrochloride (200 mg/kg) (Vetrepharm Canada Inc., Belleville, Ont, Canada) and xylazine (10 mg/kg) (Bayer Inc., Toronto, Ont, Canada). Mice were bled by section of the portal vein and aortic artery, as described by Watanabe *et al.* (1992). The liver was harvested following exsanguination as previously described (Lamontagne *et al.*, 1997). Briefly, the livers were pressed through a 70 µm cell strainer (Falcon Scientific Co., Montréal, Qc, Canada) which was then washed with 10 ml of RPMI 1640 supplemented with L-glutamine (2 mM), antibiotics (penicillin 100 U/ml and streptomycin 100 mg/ml) (GIBCO Laboratories) and 20% fetal calf serum (FCS) (Gemini Bio-Products, Woodland, CA, USA). The liver extracts were then deposited on 7 ml of FCS to allow debris sedimentation. The top layer was centrifuged 10 min at 1000g and the supernatant

was collected for virus titration and cytokine quantification by ELISA after being passed through a 0,45 µm filter (Sarstedt Inc., Montréal, Qc, Canada).

3.4.3.4- Histopathologic analysis

Livers obtained from mock-infected and L2-MHV3-infected C57BL/6 and *Tlr2*^{-/-} mice were prepared for histopathology and stained with hematoxylin-eosin.

3.4.3.5- Virus titration

The supernatants of liver extracts from C57BL/6 and *Tlr2*^{-/-} mice were used as viral suspension. They were serially diluted in 10-fold steps using RPMI 1640 and tested on L2 cells cultured in 96-well plates. Cytopathic effects, characterized by syncytia formation and cell lysis, were recorded at 72 hrs p.i. and virus titers expressed as log₁₀ TCID₅₀.

3.4.3.6- Cells

The continuous mouse fibroblast L2 cell line was grown in RPMI 1640 supplemented with 5% FCS. L2 cells were used for viral production.

Resident peritoneal macrophages from C57BL/6, *Ceacam1a*^{-/-}, SJL, and *Tlr2*^{-/-} mice were obtained by peritoneal washings using RPMI 1640 supplemented with 20% FCS and 1X 2-mercaptoethanol (GIBCO Laboratories) and enriched by adherence to plastic. Peritoneal exudate cells (10⁶) were allowed to adhere for 2 hrs and non-adherent cells were then washed away. Cell viability, ranging from 90 to 100%, was assayed by a trypan blue exclusion test (Sigma-Aldrich, Montréal, Qc, Canada). Resident peritoneal macrophages were used in this study for their natural tolerant state (Numura *et al.*, 2000) comparable to Kupffer cells.

3.4.3.7- *In vitro* viral infection

Resident peritoneal macrophages were seeded in 24-well plates at a concentration of 10^6 cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 20% FCS. Depending on the experiment, cells were treated with AgB10 (a monoclonal murine anti-CEACAM1a antibody [IgG] produced in rat and affinity-purified on a HiTrap protein G column, provided by Dr. Beauchemin) ($2 \mu\text{g}/10^6$ cells). In other conditions, functional grade TLR2 mAb ($1 \mu\text{g}/10^6$ cells; which not results in a complete inhibition of monocyte functions) (eBioscience, San Diego, CA, USA) and heparin (400U) and heparin (Sigma-Aldrich) (400U) were added for 2 hrs. In other experiments, inhibitors specific for SHP-1 (sodium stibogluconate [SS], $10 \mu\text{M}$, 15 min) (Pathak et Yi, 2001) (Sigma-Aldrich), p38 MAPK (SB203580, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, 2 hrs), ERK-1/2 MAPK (U0126, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, 2 hrs), NF- κB (SN50, $18 \mu\text{M}$, 2 hrs) or JNK (SP600125, $25 \mu\text{M}$, 2 hrs) (Calbiochem, San Diego, CA, USA) were also added prior to infection. Cells were then infected with 0,1 to 1,0 m.o.i. of infectious L2-MHV3 virus, L2-MHV3 virus treated 1 hr in phosphate buffer (GIBCO Laboratories) at pH 8,0/37°C L2-MHV3 virus treated 1 hr with UV or treated with Cells were then incubated at 37°C, under 5% CO_2 , for 24 hrs. Supernatants were collected for cytokines quantification by ELISA.

3.4.3.8- Cytokine determinations by ELISA assays

Determination of IL-6 and TNF- α levels in liver extracts from mock- or L2-MHV3-infected C57BL/6 and *Tlr2*^{-/-} mice, and in supernatants from *in vitro* infections was performed using either Mouse IL-6 or Mouse TNF- α BD OptEIA ELISA Sets (BD Biosciences, Mississauga, Ont, Canada).

3.4.3.9- Statistical analysis

For *in vivo* studies, statistical analyses were performed using an ANOVA test. For *in vitro* studies, statistical analyses were performed using a Student's t test. All

statistical analyses were calculated with the Prism 4.03 software. Error bars represent standard errors and a value of $p < 0,05$ was considered significant.

3.4.4- Results

3.4.4.1- Secretion of macrophage IL-6 and TNF- α induced by MHV3 do not depend on activation of CEACAM1a

Macrophages produce pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α during viral or bacterial infections (Edmiston *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 2002; Nunez *et al.*, 2005). In some murine strains, they also express CEACAM1a, rendering them permissive to MHV infection. We postulated that these cells produced inflammatory cytokines when infected by MHV3 through engagement of CEACAM1a, the MHV receptor. To verify this hypothesis, resident peritoneal macrophages were isolated from uninfected wild type and *Ceacam1a*^{-/-} C57BL/6 mice and infected *in vitro* with the L2-MHV3 virus. IL-6 and TNF- α released in supernatants were then quantified after 24 hrs p.i. by ELISA. Results showed that infection of wild type peritoneal macrophages with the L2-MHV3 virus induced the pro-inflammatory cytokines IL-6 ($p < 0,001$) and TNF- α ($p < 0,001$) production (Figs. 21A and 21B). Surprisingly, infection of *Ceacam1a*^{-/-} peritoneal macrophages also induced the production of IL-6 ($p < 0,001$) and TNF- α ($p < 0,001$) (Figs. 21C and 21D). Furthermore, SJL peritoneal macrophages, which express CEACAM1b, induced lower levels of IL-6 and TNF- α than C57BL/6 mice when infected with the L2-MHV3 virus (data not shown). These observations suggest that CEACAM1a is not triggered by MHV3 fixation to induce secretion of IL-6 and TNF- α by peritoneal macrophages.

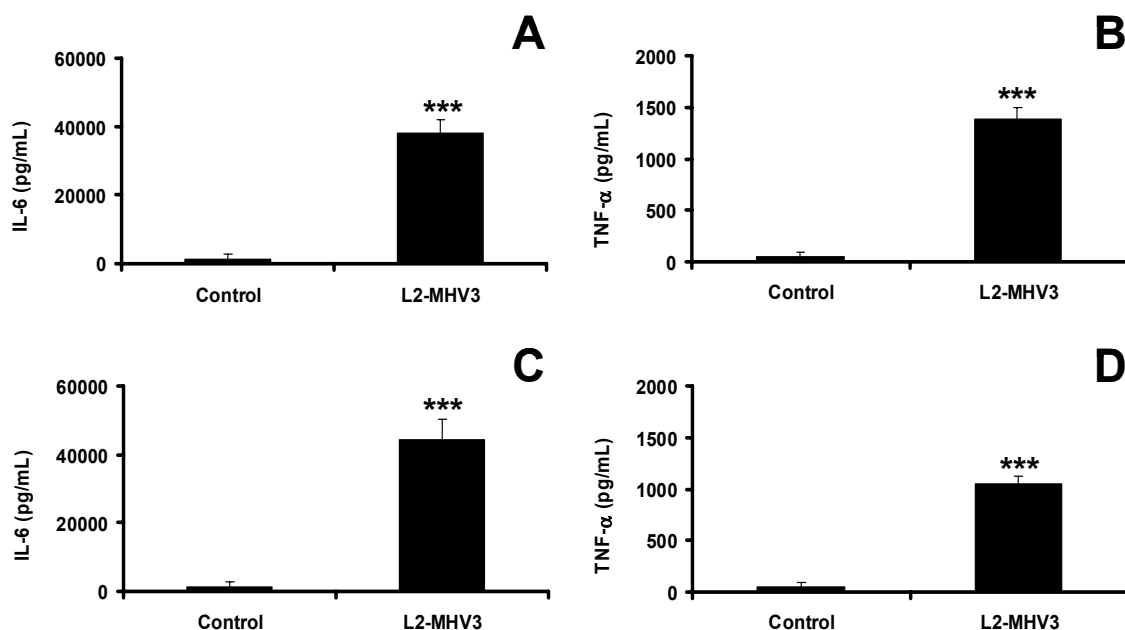


Figure 21. Production of IL-6 (A and C) and TNF- α (B and D) by *in vitro* uninfected- and L2-MHV3-infected C57BL/6 (A and B) and *Ceacam1a*^{-/-} (C and D) peritoneal macrophages at 24 hrs p.i. The cells were infected with 0,1 to 1,0 m.o.i. of the L2-MHV3 virus and the IL-6 and TNF- α levels were evaluated by ELISA. Results are representative of three experiments. (***) $p < 0,001$

To further verify that CEACAM1a is not involved in production of MHV3-induced IL-6 and TNF- α in peritoneal macrophages, these cells were isolated from C57BL/6 mice and treated with a specific anti-CEACAM1a monoclonal antibody (AgB10) or with the L2-MHV3 virus. Levels of IL-6 and TNF- α were quantified after 24 hrs p.i. Although an increase of IL-6 and TNF- α was observed in MHV3-infected peritoneal macrophages ($p < 0,001$ for both cytokines), binding of AgB10 to CEACAM1a did not trigger the secretion of IL-6 and TNF- α nor inhibit the secretion of these cytokines compared to MHV3-infected cells (Figs. 22A and 22B). Preliminary results have shown no difference in IL-6 and TNF- α levels with 1, 2, 3 or 5 μg of AgB10/ 10^6

cells. Moreover, the isotype control mAb did not induce levels of IL-6 and TNF- α in resident peritoneal macrophages (data not shown).

On the other hand, CEACAM1a may exhibit an inhibitory role in association with their immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs (ITIMs) which further recruit SHP-1 molecules (Stern *et al.*, 2005). To verify whether signals are induced by viral fixation to CEACAM1a leading to IL-6 and TNF- α production, resident peritoneal macrophages purified from uninfected C57BL/6 mice were treated 15 min with a SHP-1 inhibitor (SS), and thereafter infected with the L2-MHV3 virus. Although a slight increase of IL-6 and TNF- α was noted in SS-treated macrophages compared to untreated cells ($p < 0,001$ for both cytokines), addition of the SHP-1 inhibitor did not alter the secretion of IL-6 and TNF- α triggered by MHV3 in macrophages (Figs. 22C and 22D). These results suggest that CEACAM1 is not implicated in the production of the pro-inflammatory cytokines by MHV3-infected macrophages.

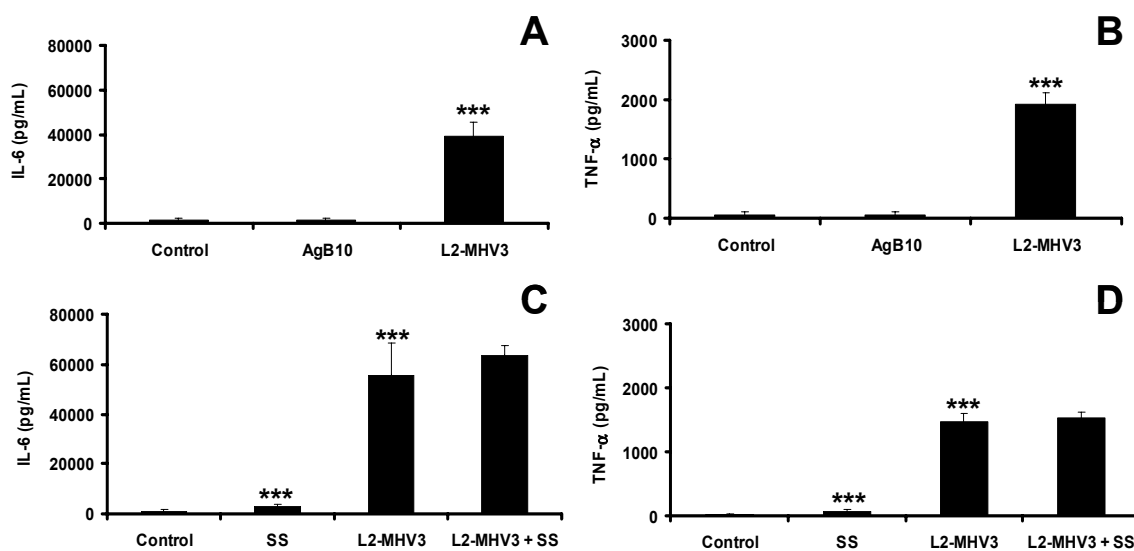


Figure 22. Production of IL-6 (A and C) and TNF- α (B and D) by *in vitro* L2-MHV3-infected C57BL/6 peritoneal macrophages in the presence of an anti-CEACAM1a antibody or a SHP-1 inhibitor. Cells were treated with a monoclonal anti-CEACAM1a mAb (AgB10 at $2 \mu\text{g}/10^6$ cells) (A and B) or with a SHP-1 inhibitor (SS at $10 \mu\text{M}$) 15 min before infection (C and D) and infected further or not with 0,1 to 1,0 m.o.i. of the

L2-MHV3 virus for 24 hrs. The IL-6 and TNF- α levels were evaluated by ELISA. Results are representative of three experiments. (***) $p < 0,001$)

3.4.4.2- Membrane regions enriched in heparan sulfate are implicated in the secretion of IL-6 and TNF- α by macrophages in the presence of MHV3

It has been reported that some isolates of coronavirus may use heparan sulfate binding sites instead of CEACAM1a as a potential entry receptor with the involvement of the S1 and S2 subunits of the MHV's spike protein (de Haan *et al.*, 2005; de Haan *et al.*, 2006). However, the further viral replication was not clearly demonstrated (Watanabe *et al.*, 2007). To verify if the pro-inflammatory cytokines induced by the L2-MHV3 virus in macrophages depend on the viral fixation to regions enriched in heparan sulfate, resident peritoneal macrophages from wild type and *Ceacam1a*^{-/-} C57BL/6 mice were treated *in vitro* with heparin, which interact with heparan sulfate, and infected further with the L2-MHV3 virus. The IL-6 and TNF- α production was then quantified in supernatant at 24 hrs p.i. Production of IL-6 by MHV3-infected wild type (Fig. 23A) and *Ceacam1a*^{-/-} (Fig. 23C) peritoneal macrophages was impaired when cells from both mouse strains were treated with heparin ($p < 0,001$ for both mouse strains when compared to MHV3-infected cells). The TNF- α levels were slightly impaired in peritoneal macrophages from both mouse strains ($p < 0,01$ for wild type mice; $p < 0,05$ for *Ceacam1a*^{-/-} mice when compared to MHV3-infected cells) (Figs. 23B and 23D).

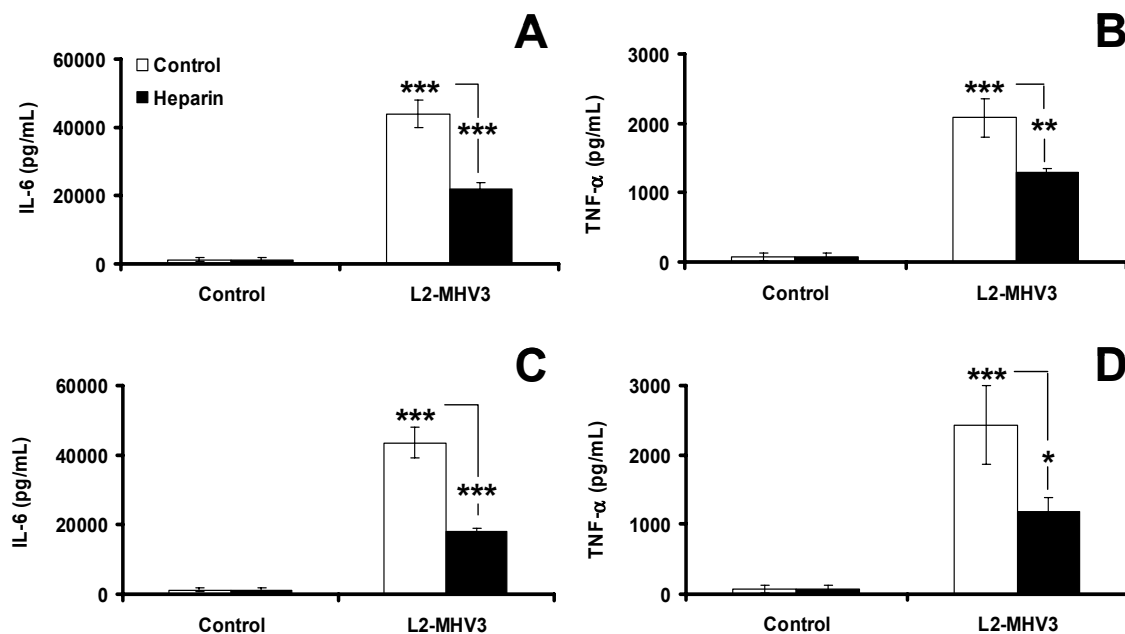


Figure 23. Production of IL-6 (A and C) and TNF- α (B and D) by *in vitro* L2-MHV3-infected C57BL/6 (A and B) and *Ceacam1a*^{-/-} (C and D) peritoneal macrophages in the presence of heparin. Cells were treated or not with heparin (400 U) 2 hrs before infection and infected further with 0,1 to 1,0 m.o.i. of the L2-MHV3 virus for 24 hrs. The IL-6 and TNF- α levels were evaluated by ELISA. Results are representative of three experiments. (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)

3.4.4.3- The MHV3 virus uses TLR2 to induce the production of IL-6 and TNF- α

Some viruses, such as HBV, HCV and herpesviruses, have been reported to promote the pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-12 and TNF- α through their fixation to TLR2 in regions enriched in heparan sulphate (Compton *et al.*, 2003; Dolgianuc *et al.*, 2004; Kurt-Jones *et al.*, 2004; Cooper *et al.*, 2005). We questioned whether TLR2 is also implicated in the establishment of an inflammatory state during the MHV infection. Resident peritoneal macrophages were purified from uninfected C57BL/6 and *Tlr2*^{-/-}

mice, infected further *in vitro* with the L2-MHV3 virus for 24 hrs and pro-inflammatory cytokines were then quantified. Results indicated that the production of IL-6 and TNF- α was not induced in *Tlr2*^{-/-} peritoneal macrophages infected with the L2-MHV3 virus compared to wild type infected cells ($p < 0,001$ for both cytokines) (Figs. 24A and 24B). The addition of a functional grade TLR2 mAb partially impaired the IL-6 ($P < 0.001$) and TNF- α ($p < 0,05$) productions by resident C57BL/6 peritoneal macrophages (Figs. 24C and 24D). The partial effect was due to the intrinsic properties of the TLR2 mAb, as specified by eBioscience. These results thus confirmed the implication of TLR2 molecules in the induction of a pro-inflammatory response during a MHV3 infection.

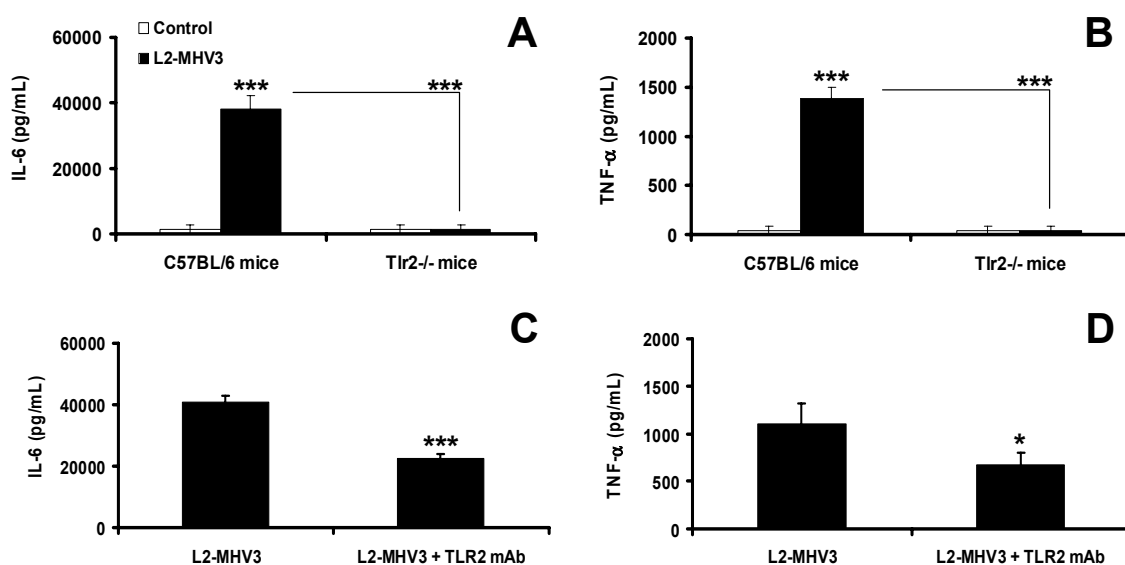


Figure 24. Production of IL-6 (A) TNF- α (B) by *in vitro* uninfected- and L2-MHV3-infected C57BL/6 and *Tlr2*^{-/-} peritoneal macrophages at 24 hrs p.i. Production of IL-6 (C) and TNF- α (D) by *in vitro* L2-MHV3-infected peritoneal macrophages from C57BL/6 mice in presence of a functional grade TLR2 mAb at 24 hrs p.i. The cells were treated with 1 $\mu\text{g}/10^6$ cells of the TLR2 mAb 2 hrs before infection. The cells were infected with 0.1 to 1.0 m.o.i. of the L2-MHV3 virus and the IL-6 and TNF- α levels were evaluated by ELISA. Results are representative of three experiments. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$)

3.4.4.4- TLR2/heparan sulfate is involved in the production of IL-6 and TNF- α in MHV3-infected macrophages through MAPK

To identify the intracellular signalling pathways involved in the TLR2/heparan sulfate region-dependent production of IL-6 and TNF- α , peritoneal macrophages from wild type and *Ceacam1a*^{-/-} C57BL/6 mice were treated with p38 (SB203580) and ERK-1/2 (U0126) MAPK inhibitors and infected *in vitro* with the L2-MHV3 virus. As shown in figures 25A and 25B, inhibition of both p38 and ERK-1/2 MAPK impaired IL-6 production by MHV3-infected wild type peritoneal macrophages (p<0,01 for the p38 inhibitor; p<0,001 for the ERK-1/2 inhibitor), whereas TNF- α was partially impaired by the ERK-1/2 inhibitor only (p<0,001). Addition of either p38 or ERK-1/2 MAPK inhibitors to MHV3-treated *Ceacam1a*^{-/-} macrophages also impaired the production of IL-6 (p<0,001 for both inhibitors) and TNF- α (p<0,01 for both inhibitors) (Figs. 25C and 25D), indicating that CEACAM1 may modulate the TNF- α pathway via the p38 MAPK molecule. Interestingly, the ERK-1/2 MAPK inhibitor induced a higher decrease of IL-6 than the p38 MAPK inhibitor in both wild type and *Ceacam1a*^{-/-} cells.

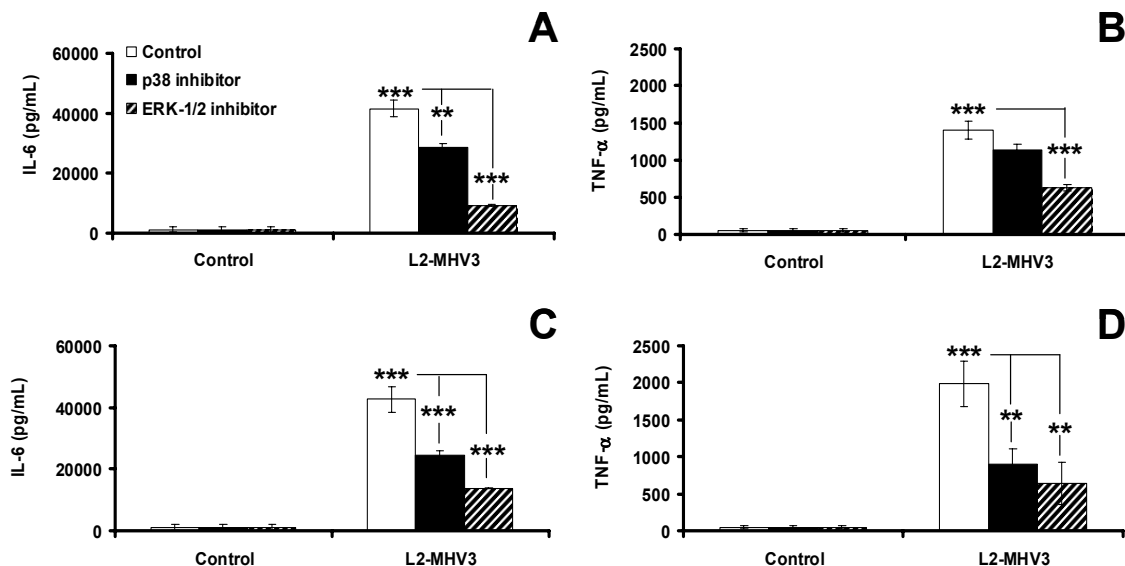


Figure 25. Roles of p38 and ERK-1/2 MAPK in the production of IL-6 (A and C) and TNF- α (B and D) by *in vitro* L2-MHV3-infected C57BL/6 (A and B) and *Ceacam1a*^{-/-} (C and D) peritoneal macrophages. The cells were treated with p38 MAPK (SB203580 at 10 μ g/ml) or ERK-1/2 (U0126 at 10 μ g/ml) inhibitors 2 hrs before infection and infected further with 0,1 to 1,0 m.o.i. of the L2-MHV3 virus for 24 hrs. The IL-6 and TNF- α levels were evaluated by ELISA. Results are representative of three experiments. (**p<0,01, ***p<0,001)

Pro-inflammatory cytokines such as IL-1, IL-6, IL-12 or TNF- α may also be induced via the activation of the NF- κ B and JNK/AP-1 (Ghosh *et al.*, 1998). To verify the implication of JNK and NF- κ B in the production of IL-6 and TNF- α from MHV3-infected peritoneal macrophages, these cells were isolated from wild type and *Ceacam1a*^{-/-} C57BL/6 mice and treated with NF- κ B (SN50) or JNK (SP600125) inhibitors. Afterwards, the cells were infected *in vitro* with the L2-MHV3 virus for 24 hrs and IL-6 and TNF- α levels were quantified. Inhibition of NF- κ B decreased levels of IL-6 (p<0,001) but not TNF- α in L2-MHV3-infected wild type peritoneal macrophages (Figs. 26A and 26B). However, addition of NF- κ B inhibitor to MHV3-treated *Ceacam1a*^{-/-} cells impaired the production of both IL-6 (p<0,001) and TNF- α (p<0,01) (Figs. 26C and 26D), indicating also that the CEACAM1a may modulate the TNF- α production via the NF- κ B molecule. In addition, inhibition of the JNK pathway greatly impaired the production of both IL-6 and TNF- α by MHV3-infected wild type and *Ceacam1a*^{-/-} peritoneal macrophages (p<0,001 for IL-6 and TNF- α in both mouse strains) (Figs. 26A to 26D). No cytotoxicity was observed in peritoneal macrophages, from both mouse strains, when treated with all of the previous inhibitors. Moreover, despite the fact that a slight TNF- α impairment was noted with the p38 MAPK and the NF- κ B inhibitors on wild type macrophages, the results remained non-significative in several experiences.

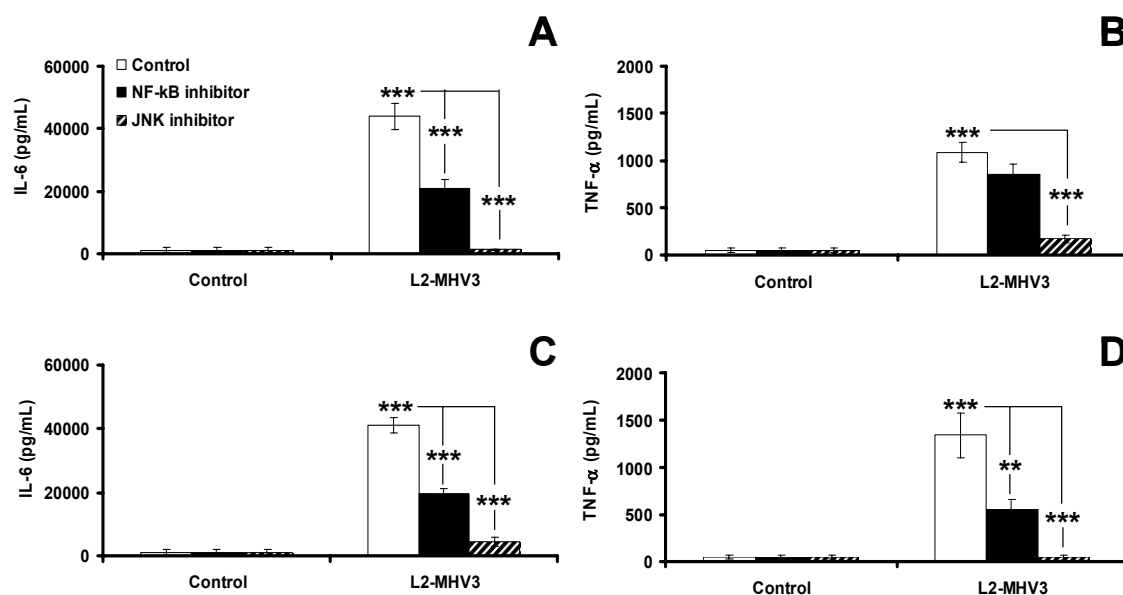


Figure 26. Roles of NF- κ B and JNK in the production of IL-6 (A and C) and TNF- α (B and D) by *in vitro* L2-MHV3-infected C57BL/6 (A and B) and *Ceacam1a*^{-/-} (C and D) peritoneal macrophages. The cells were treated with NF- κ B (SN50 at 18 μ M) or JNK (SP600125 at 25 μ M) inhibitors 2 hrs before infection and infected further with 0,1 to 1,0 m.o.i. of the L2-MHV3 virus for 24 hrs. The IL-6 and TNF- α levels were evaluated by ELISA. Results are representative of three experiments. (**p<0,01, ***p<0,001)

3.4.4.5- MHV3's S protein, but not viral replication, induces the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α

The murine coronavirus's spike (S) proteins can bind to CEACAM1a, the specific viral receptor, to infect susceptible cells (Dveksler *et al.*, 1991). S1 and S2 subunits may also be involved in heparan sulfate binding sites (de Haan *et al.*, 2006). Cytokine induction may depend on the fixation of viral proteins to the TLR2/heparan sulfate region at the cell surface. To verify this hypothesis, peritoneal macrophages were

isolated from both wild type and *Ceacam1a*^{-/-} C57BL/6 mice and infected *in vitro* with the infectious MHV3 virus or the MHV3 virus treated at pH 8,0/37°C to denature the S glycoprotein (Zelus *et al.*, 2003). IL-6 and TNF- α levels were then quantified at 24 hrs p.i. Production of IL-6 and TNF- α was decreased in both wild type (p<0,001 for IL-6; p<0,01 for TNF- α) and *Ceacam1a*^{-/-} (p<0,001 for IL-6; p<0,01 for TNF- α) peritoneal macrophages in the presence of pH 8,0/37°C-treated MHV3 compared with the levels of cytokines in the presence of infectious MHV3 virus (Figs. 27A and 27B).

To verify if the intracellular viral replication may be also involved in the induction of cytokines, a similar experiment was conducted with UV-inactivated viruses. As shown in the figures 27C and 27D, the inactivation of the virus with UV did not inhibit the production of IL-6 and TNF- α in MHV3-treated wild type and *Ceacam1a*^{-/-} macrophages. No viral replication was observed in the cell cultures, as confirmed via a MHV3 immunolabelling.

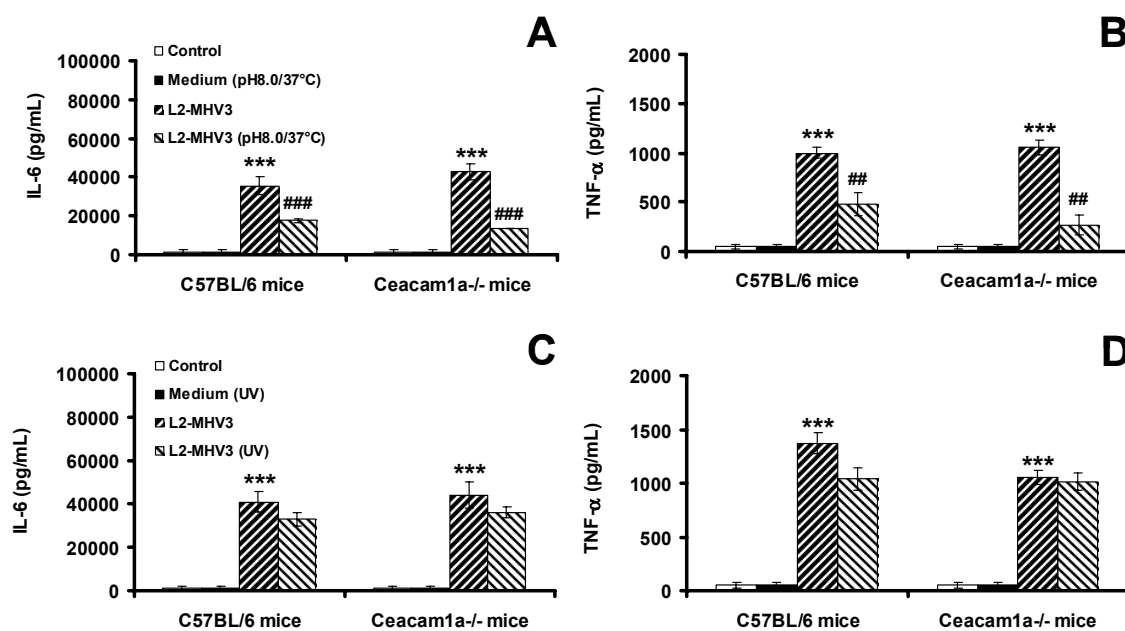


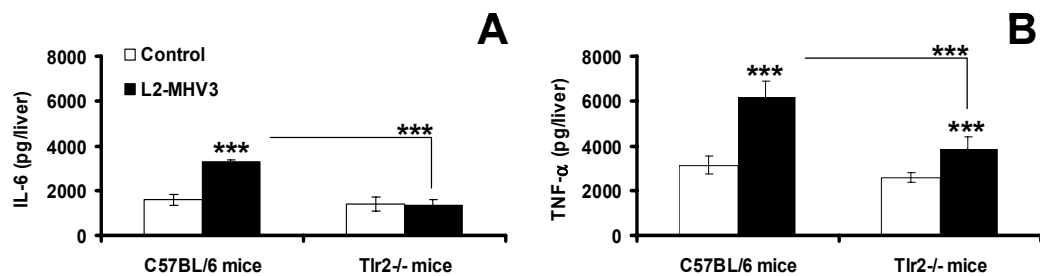
Figure 27. Roles of viral S protein and viral replication in the production of IL-6 (A and C) and TNF- α (B and D) by *in vitro* L2-MHV3-infected C57BL/6 (A and B) and *Ceacam1a*^{-/-} (C and D) peritoneal macrophages. The cells were infected for 24 hrs with

0,1 to 1,0 m.o.i. of the infectious L2-MHV3 virus, the L2-MHV3 virus treated at pH 8,0/37°C (A and B) or the L2-MHV3 virus inactivated with UV (C and D). The IL-6 and TNF- α levels were evaluated by ELISA. Results are representative of three experiments. (**p<0,001 when compared to control cells, ##p<0,01 and ###p<0,001 when compared to MHV3-infected cells)

3.4.4.6- Production of IL-6 and TNF- α in the liver of MHV3-infected C57BL/6 and *Tlr2*^{-/-} mice

Human viral hepatitis is strongly associated with high inflammatory response in the liver (Riordan *et al.*, 2006). It has also been demonstrated that the pathogenic L2-MHV3 virus induces an acute hepatitis in susceptible C57BL/6 mice with inflammatory foci in intrahepatic tissues (Martin *et al.*, 1994). To verify if IL-6 and TNF- α induced by fixation of S viral protein to TLR2/heparan sulfate receptors participate in the histopathologic disorders, levels of these cytokines were quantified in total liver extracts from MHV3-infected C57BL/6 and *Tlr2*^{-/-} mice at 96 hrs p.i. As shown in figure 28 (section I-A), intrahepatic IL-6 levels increased in MHV3-infected C57BL/6 mice (p<0,001) compared to mock-infected mice, but not in MHV3-infected *Tlr2*^{-/-} mice (p<0,001 compared to infected C57BL/6 mice). Despite the fact that intrahepatic TNF- α was induced in MHV3-infected C57BL/6 and *Tlr2*^{-/-} mice (p<0,001 for both mice), the levels remained lower in the livers from *Tlr2*^{-/-} mice than from wild type mice (p<0,001 compared to infected C57BL/6 mice) (Fig. 28, section I-B). Histological analysis of livers (Fig. 28, Section II) revealed an extensive necrosis with inflammatory foci only in surviving MHV3-infected C57BL/6 (Figs 28, section II-A and II-B), whereas low inflammatory foci were detected in livers from *Tlr2*^{-/-} mice (Fig. 28, section II-C and II-D). The virus titers found in the liver of MHV3-infected C57BL/6 and *Tlr2*^{-/-} mice were respectively $10^{9,0} \pm 10^{0,1}$ and $10^{7,6} \pm 10^{0,8}$ virus/liver (p<0,05). Thus, the levels of IL-6 and TNF- α may be related to the extensive necrosis observed in the liver of C57BL/6 mice infected with the pathogenic L2-MHV3 virus.

SECTION-I



SECTION-II

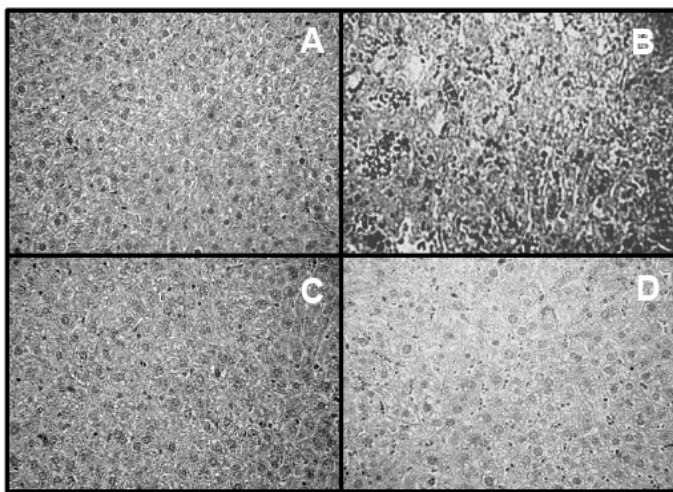


Figure 28. Section I- Intrahepatic IL-6 (A) TNF- α (B) levels in liver extracts from mock-infected and L2-MHV3-infected C57BL/6 and *Tlr2*^{-/-} mice at 96 hrs p.i. Four mice were used in each experimental group and infected with 1000 TCID₅₀ of the L2-MHV3 virus. (***) $p < 0,001$) **Section II-** Histopathologic observations of livers from control (A and C) and L2-MHV3-infected (B and D) C57BL/6 (A and B) and *Tlr2*^{-/-} (C and D) mice at 96 hrs p.i.

3.4.5- Discussion

In this study, we have demonstrated that the MHV3's protein S used TLR2 and heparan sulfate regions, on the cell surface of peritoneal macrophages to promote the secretion of IL-6 and TNF- α . Viral fixation to TLR2/heparan sulfate triggers the activation of the p38 MAPK, ERK-1/2 MAPK, NF- κ B and JNK pathways. These results suggest a new mechanism by which surface viral proteins may induce an inflammatory response by their fixation to nonspecific cell surface receptors. In addition, our results revealed a new modulating role for CEACAM1a on macrophages in the secretion of TNF- α via the p38 MAPK and NF- κ B pathways.

Our results suggest also that TLR2 associated with heparan sulfate can be considered as a new viral PPR since their engagement by viral S protein initiates production of inflammatory cytokines, as already described for TLRs, helicases RIG-1, MDA5 or PKR (Unterholzner et Bowie, 2008).

Herein, we have demonstrated that induction of pro-inflammatory cytokines does not result from activation of CEACAM1a, even when these molecules are used as specific receptor for MHV viruses on target cells in susceptible C57BL/6 mice (Dveksler *et al.*, 1991). In fact, *Ceacam1a*^{-/-} mice are completely resistant to MHV-A59 infections (Hemmila *et al.*, 2004). The irrelevance of CEACAM1a engagement in the production of viral-induced inflammatory cytokine is supported by the comparable secretion of IL-6 and TNF- α by macrophages from both wild type and *Ceacam1a*^{-/-} C57BL/6 mice, and by experiments conducted in presence of specific anti-CEACAM1a mAb and SHP-1 inhibitors. Treatment of uninfected peritoneal macrophages from C57BL/6 mice with the AgB10 mAb did not induce the production of IL-6 and TNF- α . Furthermore, addition of an inhibitor to SHP-1, implicated in the CEACAM1a signaling pathway (Stern *et al.*, 2005), did not impair cytokine production by C57BL/6 macrophages. These results demonstrated that CEACAM1a is not involved in the induction of the inflammatory cytokines by MHV3-infected macrophages. However, this conclusion does not totally exclude the possibility that cytokine production may be associated with intracellular pathways related to CEACAM1a, as demonstrated by a

slight increase of IL-6 and TNF- α in macrophages from C57BL/6 mice treated with the SHP-1 inhibitor. The production of IL-6 and TNF- α in SJL-derived macrophages also indicates that CEACAM1b is not involved. However, it was reported that incubation of dendritic cells with a specific CEACAM1a mAb (AgB10) promotes the release of various chemokines and cytokines, such as macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , MIP-2, IL-6 and IL-12, and increases the expression of the co-stimulatory molecules CD40, CD54, CD80 and CD86 on these cells (Kammerer *et al.*, 2001). The CEACAM1a pro-inflammatory properties may be regulated differently in various cell types.

We have demonstrated that production of IL-6 and TNF- α depends rather on heparan sulfate since treatment of peritoneal macrophages from wild type and *Ceacam1a*^{-/-} C57BL/6 mice with heparin impaired their production. This observation suggests that the MHV3 virus may use heparan sulfate or a closely related receptor to induce the production of cytokines by macrophages, rather than CEACAM1a receptor. In fact, the production of IL-6 and TNF- α by MHV3-infected peritoneal macrophages is induced by viral fixation to a receptor located in regions enriched in heparan sulfate but not by the viral replication, as demonstrated by experiments using viruses with denaturated S protein or UV-inactivated viruses. Thus, denaturation of viral S protein by a pH 8.0 incubation at 37°C inhibited the production of IL-6 and TNF- α , whereas UV inactivation of the MHV3 virus, which does not alter the viral fixation to the cell surface but inhibits a efficient viral replication (confirmed by a MHV3 immunolabelling), did not impair the production of IL-6 and TNF- α in C57BL/6 or *Ceacam1a*^{-/-} peritoneal macrophages. Therefore, these results revealed that viral replication is not essential for induction of TNF- α and IL-6 and that presence of viral S protein is sufficient to stimulate production of cytokines by macrophages. The induction of pro-inflammatory cytokines in absence of viral replication reinforces the role of surface TLR2 molecules to detriment of the activation of intracellular TLRs, such as TLR3 and TLR7/8, which detect viral dsRNA and ssRNA (Andersen *et al.*, 2006; Cervantes-Barragan *et al.*, 2007).

It has been previously reported that murine coronavirus showing extended host range used heparan sulfate as an entry receptor. However, the change from a restricted

CEACAM1 tropism to an extended host range has been associated with only few mutations in the S1 subunit, which are generally obtained from in persistently infected cell cultures (de Haan *et al.*, 2006). It was also reported that treatment of susceptible cells with heparin inhibits the infection with an extended-host range MHV-A59 variant (de Haan *et al.*, 2005). The MHV3 used in this work is not a host-range variant because it has been produced *in vivo* in the liver from susceptible mice before 2 or 3 *in vitro* passages into L2 cells indicating that the ability of the MHV3 virus to bind heparan sulfate receptors is a general property of this virus. The partial inhibition of MHV3 virus by heparin suggest that the viral envelope may possess positively charged amino acids which interact with negatively charged sulfate groups on susceptible cells, as already demonstrated with HSV-1, HSV-2, HIV-1 and SARS (Vicenzi *et al.*, 2004).

We have observed that IL-6 and TNF- α productions in MHV3-infected C57BL/6 peritoneal macrophages depended on ERK-1/2 MAPK and JNK, whereas p38 MAPK and NF- κ B pathways were only involved in IL-6 production. It has been reported that the p38 and ERK-1/2 MAPK pathways were activated early in MHV3-infected Swiss-Webster peritoneal macrophages (McGilvray *et al.*, 1998), but receptors involved in this activation were not identified. The respective roles of p38 MAPK, ERK MAPK and JNK pathways in MHV viral replication have not yet been determined. However, the p38 MAPK and JNK pathways, but not the ERK-1/2 pathway, were activated in MHV-A59-infected J774.1 cells. In addition, UV-irradiated MHV-A59 did not activate the MAPKs (Banerjee *et al.*, 2002).

Nevertheless, the downstream activation of CEACAM1 seems to involve especially the ERK-1/2 MAPK pathway, whereas expression of CEACAM1 signalling pathway may be regulated through the NF- κ B pathway (Budt *et al.*, 2002; Muenzner *et al.*, 2002; Singer *et al.*, 2002). We have rather demonstrated that the viral fixation to CEACAM1a receptor is not directly involved in the secretion of IL-6 and TNF- α by MHV3-infected peritoneal macrophages since these cytokines were also induced in cells from *Ceacam1a*^{-/-} mice and regulated by the MAPKs pathways. However, Scheffrahn *et*

al. (2005) proposed that CEACAM1a could either inhibit or stimulate the activation of the ERK-1/2 MAPK pathway depending on the cell type and the cell state.

Activation of TLRs leads to the secretion of pro-inflammatory cytokines through the activation of NF- κ B. Indeed, inhibition of NF- κ B pathway partially inhibits IL-6 and TNF- α production by macrophages isolated from *Ceacam1a*^{-/-} mice. Furthermore, the p38 and ERK-1/2 MAPK pathways can be induced by peptidoglycan/TLR2 activation in different cell types such as Kupffer cells or eosinophils (Thobe *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2007). Nevertheless, no information is available on the regulation of CEACAM-mediated intracellular signalling activation by TLRs. Our results suggest that CEACAM1a may regulate the secretion of TNF- α via the p38 MAPK and NF- κ B pathways.

The results obtained with MHV3-infected *Tlr2*^{-/-} mice suggest that TLR2 molecules are crucial in the production of IL-6 and TNF- α and in the levels of infectious viruses, within the induction of histopathologic disorders. Those results also suggest that viruses which possess glycoproteins and an envelope, such as coronaviruses, may induce a strong inflammatory response directly by their fixation to TLRs and membranes enriched in heparan sulfate via the S protein or by free S proteins, without viral replication. The PPR role of the TLRs and the heparan sulfate receptor in the presence of infectious viruses demonstrated a new viral mechanism for amplification of the inflammatory response, thus explaining the severity of diseases induced by human or mouse coronaviruses. Cytokines regulation in coronavirus infections has been poorly explored. Our results indicate that the MHV3 virus is a powerful model for such studies. We have demonstrated that the murine coronavirus MHV3 can stimulate the production of IL-6 and TNF- α by activating TLR2/heparan sulfate regions at the cell surface of macrophages. In addition, these results suggest an interesting mechanism by which a virus and its viral surface proteins may regulate the immune response in addition to viral replication in macrophages.

On the other hand, the surface TLR4 and intracellular TLR9 are induced during a SARS-CoV infection and correlate with the production of IL-6 and IFN- γ (Okabayashi

et al., 2006). Preliminary results have shown a slight impairment of IL-6 and TNF- α when *Ceacam1a*^{-/-} resident peritoneal macrophages infected with MHV3 were treated with a functional grade TLR4 mAb (eBioscience) (data not shown). It was recently demonstrated that the MHV-A59 and SARS-CoV viruses produce IFN- α via the activation of the intracellular TLR7 in plasmacytoid dendritic cells, thus controlling the viral infection (Cervantes-Barragan *et al.*, 2007). However, the MHV-A59 and MHV-JHM viruses were not able to induce IFN- α via the activation of intracellular TLR3, indicating that the double stranded viral RNA is not accessible to cellular PPRs (Zhou et Perlman, 2007).

However, the interaction between CEACAM1a and other TLRs needs to be further investigated. Having identified these new PPRs, coronavirus infections, such as the SARS, should be more adequately controlled or in some cases, exploited. In other viral infections, it was reported that the interaction between the HSV-1 and TLR2 contributed to lethal encephalitis, whereas human cytomegalovirus promotes the secretion of pro-inflammatory cytokines by its fixation to TLR2 and CD14 (Compton *et al.*, 2003; Kurt-Jones *et al.*, 2004). Thus, TLRs seemed to be primordial during viral infections in the establishment of an innate immunity, but a stronger inflammatory response can also aggravate the disease without increase the viral replication.

The use of pathogenic MHV3 variants could be an excellent tool to study the role of Kupffer cells in the production of pro-inflammatory cytokines and the further establishment of hepatic tissular damages during acute viral hepatitis.

Further work is in progress to better discriminate the roles of CEACAM, TLRs, heparan sulfate and viral constituents in the production of inflammatory and immunosuppressive cytokines by hepatic cells infected with attenuated MHV3 variants.

3.4.6- Acknowledgements

This work was supported by a grant from NSERC-Canada. A. Jacques was supported by a Canadian NSERC studentship.

4- DISCUSSION

4.1- Le recrutement et l'apoptose des cellules NK durant l'hépatite aiguë induite par le virus MHV3

Les cellules NK sont essentielles à la protection contre les infections induites par les virus HSV-1 et MCMV de même que contre les virus des hépatites humaines (Salazar-Mather *et al.*, 1998; Gosselin *et al.*, 1999; Guidotti et Chisari, 2001; Frese *et al.*, 2002). Au cours de l'infection induite chez la souris par le virus pathogène L2-MHV3, la réponse immunitaire innée est largement sollicitée et le maintien des cellules NK est primordial à la défense antivirale et à la survie des souris susceptibles C57BL/6. En effet, il avait déjà été montré que l'élimination *in vivo* des cellules NK rendait les souris plus susceptibles à l'hépatite induite par le virus MHV3 (Bukowski *et al.*, 1983). Nous avons montré, au chapitre 3, la présence d'un fort recrutement des cellules NK en provenance de la moelle osseuse et de la rate vers le foie à partir de 36 heures post-infection. Le recrutement des cellules NK vers le foie pourrait dépendre de la production d'IFN- α/β par les cellules dendritiques plasmacytoïdes en présence du virus MHV (Cervan-Barragan *et al.*, 2007). Il a déjà été montré, lors de l'infection par le MCMV, que la production d'IFN- α/β de même que de MIP-1 α favorisait le recrutement de cellules NK dans le foie (Salazar-Mather *et al.*, 1998; Salazar-Mather *et al.*, 2000). De même, ces cellules NK expriment plusieurs récepteurs à chimiokines dont les CXCR3, CXCR4, CXCR6 et CCR5, augmentant leur mobilisation cellulaire vers le foie (Shields *et al.*, 1999; Campbell *et al.*, 2001; Johnston *et al.*, 2003).

Toutefois, les cellules NK recrutées au niveau du foie des souris infectées par le virus pathogène L2-MHV3 mourraient par apoptose dès 48 heures post-infection. L'apoptose de ces cellules, caractérisée par des tests TUNEL sur lames, résultait de l'infection virale puisqu'il a été possible d'observer des syncytia contenant des noyaux apoptotiques, des protéines virales de même que les protéines DX5 caractérisant les cellules NK. Afin de confirmer la permissivité des cellules NK à l'infection virale, ces cellules ont été directement phénotypées à l'aide d'un double immunomarquage avec des anticorps polyclonaux anti-MHV3 et du marqueur DX5. Ainsi, les cellules NK infectées mourraient par apoptose suite à la formation de syncytia due à la propriété de

fusion de la protéine virale S (Gallagher et Buchmeier, 2001). Cette découverte de la permissivité de cellules NK à la réplication du virus MHV a ouvert la possibilité que ce virus pouvait altérer les mécanismes de défense innée comme il est capable de le faire pour la réponse immune adaptative (Jolicœur et Lamontagne, 1989; Lamontagne *et al.*, 1989b; Jolicœur et Lamontagne, 1994).

Cet effet apoptotique induit par l'infection virale est associé à une diminution de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 (An *et al.*, 1999). Il est connu que l'IL-15, mais non pas l'IL-12, peut augmenter les niveaux intracellulaires de Bcl-2 (Armant *et al.*, 1995, Carson *et al.*, 1997; Cooper *et al.*, 2002). Ainsi, la présence d'IL-15 pourrait permettre le maintien de la défense immunitaire innée en préservant les cellules NK au cours de l'hépatite aiguë. Cependant, nous avons montré (chapitre 3.1) que les cellules NK myéloïdes de plus forte dimension (cellules en division), obtenues *in vitro* suite à l'ajout de rIL-15 durant 7 jours, étaient plus permissives à l'infection virale au contraire des cellules NK de dimension normale (cellules matures). Par contre, les cellules NK intrahépatiques sont des cellules matures qui ont été recrutées par le foie et qui ne sont plus en processus de maturation cellulaire. Effectivement, des résultats préliminaires *in vitro* montrent que l'apoptose des cellules NK intrahépatiques, lors d'une infection par les virus pathogène L2-MHV3 ou non pathogène YAC-MHV3, est plutôt diminuée en présence de rIL-15 pour une durée de 24 heures. Cette diminution était plus faible en présence de rIL-18 et absente en présence de rIL-12. De plus, la réplication virale chez les lymphocytes intrahépatiques a été diminuée *in vitro* lors de l'ajout de rIL-15 en même temps que le virus L2-MHV3 ou 24 heures avant l'infection. Cette protection des cellules NK par l'IL-15 serait possiblement due à une augmentation de l'expression de Bcl-2 et une baisse de la caspase-3. Comme l'IL-15 est un inducteur potentiel d'IFN- γ par les cellules NK et que l'IFN- γ semble être important dans le contrôle de l'hépatite aiguë (Lucchiari *et al.*, 1992; Mello *et al.*, 1993; Moreira *et al.*, 2004), il n'est pas exclu que les baisses de réplication virale et d'apoptose observées avec les cellules NK et les lymphocytes intrahépatiques soient dues à cette cytokine. Cependant, des dosages préliminaires suggèrent une diminution importante de la production d'IL-15 hépatique durant les 3 premiers jours d'infection par le virus pathogène L2-MHV3.

4.2- Le tropisme cellulaire des variants de pathogénicité du virus MHV3 dirige la tolérance immunitaire hépatique

Le recrutement des cellules lymphoïdes au niveau du foie est majoritairement contrôlé par les LSEC qui sont impliquées dans l'induction d'un état de tolérance immunologique (Knolle *et al.*, 1999a; Knolle *et al.*, 1999b; Limmer *et al.*, 2000). En effet, il a été démontré que les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ devenaient anergiques lors de leur contact avec les LSEC dans les sinusoides hépatiques. Cette tolérance immunitaire serait induite par l'action de l'IL-10 et de la PGE₂, sécrétées par les KC, et par la diminution des molécules de co-stimulation à la surface des LSEC qui sont nécessaires à l'activation des cellules T (Knolle *et al.*, 1998). Également, le TGF-β, sécrété par les LSEC et KC, est impliqué dans la suppression de la prolifération des cellules T (Schroder *et al.*, 2003). Ainsi, la perte de ces cytokines immunosuppressives, rapporté dans le chapitre 3.2, pourrait expliquer le recrutement des cellules NK et/ou NK-T dans le foie des souris infectées par les virus L2-MHV3 et 51.6-MHV3. Les KC libèrent également certaines cytokines pro-inflammatoires, telles que les IL-12, IL-15 et IL-18, permettant une activation subséquente des cellules NK (Gerdes *et al.*, 2002; Leifeld *et al.*, 2002). Il n'est pas exclu que les cellules NK et NK-T peuvent aussi être recrutées au niveau du foie par des chimiokines, telles que MIP-1α, MIP-1β, ou MCP-1, MCP-2, MCP-3 ou CXCL10, sécrétées par les KC au cours de l'infection (Orange *et al.*, 2002; Kolios *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2008). Quoique ces divers mécanismes impliqués dans la tolérance immunologique du foie fussent connus, il n'était pas possible de mesurer l'importance relative de chacun d'eux. Ainsi, la capacité du virus MHV3 à infecter autant les hépatocytes, les LSEC et les KC pouvait expliquer la rapidité de l'hépatite et le bris de tolérance immunitaire, mais ne permettait pas de déterminer lequel(s) des dérèglements de tolérance étai(en)t le(s) plus important(s) dans le développement de l'hépatite aiguë.

L'utilisation de variants de pathogénicité MHV3 montrant des tropismes cellulaires différents pour les LSEC et les KC a permis de démontrer que la

susceptibilité des deux types de cellules à l'infection virale influençait le niveau de tolérance immunitaire de même que les populations cellulaires hépatiques NK et NK-T au cours de l'infection. En fait, l'infection de souris C57BL/6 par le virus MHV3 a permis de déterminer que les KC étaient davantage impliquées dans l'inflammation et le recrutement des cellules NK alors que les LSEC seraient responsables de la tolérance immunitaire. Ainsi, l'infection des KC pourrait permettre la sécrétion de chimiokines, recrutant les cellules NK, et de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- α , aggravant les dommages tissulaires hépatiques. Les cytokines immunosuppressives IL-10, TGF- β et PGE₂ sont connues pour diminuer la production d'IL-6 et de TNF- α en réponse au LPS ou diminuer l'activation des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ recrutées au niveau du foie (Knolle *et al.*, 1998). Il avait déjà été rapporté que la PGE₂ était impliquée dans l'inhibition de la coagulation intravasculaire induite au niveau des LSEC lors d'une infection par le virus MHV3 (Abecassis *et al.*, 1987). La production de PGE₂ observée avec les variants atténués du virus MHV3 démontre l'importance de cette cytokine dans la pathologie. Le fait que les LSEC ne soient pas infectées par les variants atténués favorise davantage la production de PGE₂, ce qui supporte l'hypothèse que la présence de la PGE₂ pourrait empêcher la coagulation intravasculaire et diminuer les lésions hépatiques (Abecassis *et al.*, 1987). Effectivement, au cours de l'infection par le virus pathogène L2-MHV3, les cytokines immunosuppressives hépatiques IL-10, TGF- β et PGE₂ ont été diminuées ou n'étaient pas induites.

Les résultats obtenus avec le modèle MHV3 pour l'hépatite aiguë diffèrent des observations faites chez des patients atteints d'hépatite virale. Ainsi, les cytokines immunosuppressives IL-10, TGF- β et PGE₂ ont plutôt été augmentées lors d'infections chroniques par les virus HBV et HCV (Cheng *et al.*, 2004; Waris et Siddiqui, 2005; Akpolat *et al.*, 2005; Ayada *et al.*, 2006; Verma *et al.*, 2008; Saito *et al.*, 2008). Des études chez l'humain ont montré que les T_{regs} étaient également augmentées au cours de l'hépatite chronique induite par le HBV et joueraient un rôle dans la persistance virale due à une production d'IL-10 (Peng *et al.*, 2008). Cet effet a également été observé lors d'une infection chronique par le LCMV (Blackburn et Wherry, 2007). Cette différence

apparente entre les résultats obtenus avec le modèle MHV3 et les infections virales humaines peuvent refléter le moment de l'infection. Ainsi, dans le modèle MHV3, nous avons étudié les anomalies induites dans les premiers trois jours d'infection, ce qui n'est pas tout à fait le cas chez des patients infectés avec les virus HBV et HCV depuis plusieurs jours. Bien que les cytokines immunosuppressives IL-10, TGF- β et PGE₂ aient été augmentées dans le foie des patients infectés par les virus HBV ou HCV, cette augmentation peut refléter la gravité de la réaction inflammatoire depuis plusieurs jours et ne pas être suffisante pour l'inhiber ou du moins la réduire. Des études ont montré que l'administration d'IL-10 pendant une période de 12 mois chez des patients infectés chroniquement par le HCV provoquait un effet anti-inflammatoire et pourrait être considéré comme une thérapie à long terme. En effet, l'IL-10 engendrerait une chute de l'inflammation hépatique, un changement vers une réponse Th2 et une diminution du nombre de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques au HCV recrutées au niveau du foie (Nelson *et al.*, 2003). Une augmentation transitoire du niveau d'ARN viral a toutefois été détectée, possiblement due à une altération de la surveillance immunologique (Nelson *et al.*, 2003). Ces observations chez l'humain de même que celles notées chez les souris *Tlr2*^{-/-} suggèrent que la diminution de la réaction inflammatoire induite au cours de l'infection virale chronique avec le HCV, ou aiguë avec le virus MHV3, pourrait améliorer les signes cliniques et le fonctionnement hépatique. Par contre, les résultats obtenus à date ne permettent pas d'établir un lien direct entre le niveau d'inflammation et le niveau de réplication virale dans les cellules hépatiques. Il est possible que la diminution de cytokines pro-inflammatoires, incluant l'IFN- γ , ne favorise pas l'expression du récepteur CEACAM1a chez les KC et LSEC, diminuant ainsi la réplication du virus MHV3 dans ces cellules. Effectivement, il est connu que l'IFN- γ produit par les cellules NK soit impliqué dans le contrôle de la réplication du HCV (Guidotti et Chisari, 2001; Frese *et al.*, 2002). Chez des souris *IL-10*^{-/-} infectées par le virus neurologique MHV-JHM, une augmentation de la morbidité et de la mortalité a été observée. Une légère infiltration de cellules mononucléées dans le système nerveux central a été notée, en relation avec des augmentations de TNF- α et d'IFN- γ . Cependant, l'IL-10 ne serait pas requise dans le processus d'élimination virale

(Lin *et al.*, 1998). L'effet immunosuppresseur de l'IL-10, sécrétée par les KC et les T_{regs}, serait également important dans la tolérance contre l'hépatite fulminante induite par la ConA (Erhardt *et al.*, 2007).

Les cellules NK jouent un rôle important dans la résolution de l'hépatite aiguë induite par le HCV. Or, la production de TGF- β provoquerait la suppression de la prolifération et de la cytotoxicité des cellules NK, rendant ces cellules inaptées à contrer l'infection virale (Kimura *et al.*, 2006). Toutefois, le TGF- β aurait un effet antiviral contre le HBV en inhibant la transcription de l'ARN pré-génomique du HBV, diminuant les dommages tissulaires hépatiques (Chou *et al.*, 2007).

Quant à la PGE₂, une étude a montré que l'administration orale de cette cytokine chez des patients chroniquement infectés par le HBV ou le HCV diminuait la réplication du HBV seulement (Hyman *et al.*, 1999). Une autre étude a plutôt rapporté que les monocytes du sang périphérique produiraient de la PGE₂, jouant ainsi un rôle dans la suppression des cellules T lors de l'infection chronique par le HCV (Marinho *et al.*, 2002).

4.3- Les fonctions des cellules NK durant l'hépatite aiguë induite par le virus MHV3

Durant la réponse immunitaire innée, l'IFN- γ est normalement sécrété par les cellules NK et les cellules NK-T alors que l'IL-4 l'est par les cellules NK-T. Le ratio IFN- γ /IL-4 permet donc de représenter le ratio cellulaire NK/NK-T activées. Au cours de l'infection par les virus pathogène L2-MHV3 et faiblement atténué 51.6-MHV3, une augmentation du ratio NK/NK-T a été observée entre 24 et 72 heures post-infection, pour les cellules normales et/ou les cellules apoptotiques. Ce phénomène était absent ou relativement faible pour les variants fortement atténué CL12-MHV3 et non pathogène YAC-MHV3. Parallèlement, le ratio IFN- γ /IL-4 a chuté chez les souris infectées par le virus pathogène L2-MHV3 alors qu'il a augmenté graduellement avec les variants fortement atténué CL12-MHV3 et non pathogène YAC-MHV3. De plus, il a été observé

que le niveau d'IFN- γ hépatique chutait après 72 heures d'infection chez les souris infectées par le virus pathogène L2-MHV3. Ces observations rejoignent les résultats obtenus par Stohlman *et al.* (1983) qui montraient que les cellules NK recrutées de la rate, au cours d'une infection par le virus MHV-JHM, n'étaient pas en mesure de produire de l'IFN- γ , mais le mécanisme impliqué n'avait pas été identifié.

Il est connu que les niveaux d'IL-10 et de TGF- β déterminent le potentiel d'inhibition de l'IFN- γ (Schroder *et al.*, 2003), suggérant qu'une diminution de l'IL-10 et du TGF- β chez les souris infectées par le virus pathogène L2-MHV3 provoquerait une augmentation de l'IFN- γ hépatique et subséquemment, une hausse de la réponse antivirale et inflammatoire. Cependant, les niveaux d'IFN- γ n'ont pas été augmentés chez ces souris au cours de l'infection. La permissivité des cellules NK et NK-T à l'infection virale et à leur apoptose subséquente pourrait expliquer l'absence de production d'IFN- γ par ces cellules.

L'IFN- γ joue un rôle important dans le contrôle des infections par les virus MHV. L'injection d'IL-12 et d'IL-18 chez des souris susceptibles a augmenté le niveau d'IFN- γ hépatique et protégé ces souris contre une infection subséquente par le virus MHV3 (Moreira *et al.*, 2004). Nos résultats sur les infections *in vitro* des cellules NK intrahépatiques et myéloïdes ont démontré qu'elles n'étaient pas en mesure de produire de l'IFN- γ lorsqu'elles étaient infectées par le virus L2-MHV3 (chapitre 3.3).

Lors de l'hépatite aiguë induite par le virus pathogène L2-MHV3, nous avons observé que les niveaux d'IL-12, d'IL-18 et d'IFN- γ hépatiques étaient diminués par rapport aux souris contrôles. L'incapacité des KC infectées à produire de l'IL-12 et de l'IL-18 et subséquemment à activer les cellules NK pourrait expliquer l'absence d'augmentation de l'IFN- γ dans le foie. L'ajout de rIL-12 et de rIL-18 à des cellules NK en présence de virus MHV3 a toutefois permis d'induire une production d'IFN- γ par ces cellules NK. Étonnamment, cette production d'IFN- γ a été très fortement induite chez les cellules NK infectées en présence des cytokines recombinantes. Cet effet synergique dans la production d'IFN- γ par les cellules NK, résultant de l'interaction entre une

réplication virale et la présence d'IL-12 et/ou IL-18, n'avait jamais été observé auparavant.

Par ailleurs, le virus MHV3 utilise comme récepteur spécifique reconnu la molécule CEACAM1. Cette dernière serait impliquée dans l'inhibition de la production d'IFN- γ par les cellules NK-T (Markel *et al.*, 2002b), ce qui suggère que cette molécule pourrait agir de façon similaire chez des cellules NK. Curieusement, la molécule CEACAM1a est essentielle à l'induction de la production synergique d'IFN- γ via la fixation du virus MHV3, et sa réplication subséquente. Effectivement, aucune synergie n'a été observée chez les cellules NK provenant de souris *Ceacam1a*^{-/-}, suggérant que la fixation sur le récepteur CEACAM1a et/ou la réplication virale est primordiale à cette production d'IFN- γ .

Les résultats obtenus avec le virus L2-MHV3 traité aux UV a permis de cibler la réplication virale comme élément essentiel à ce phénomène. De plus, il a été montré que la p38 MAPK, mais non les molécules ERK-1/2 MAPK, était impliquée dans la réplication du virus MHV-A59 dans des cellules J774.1 (Banerjee *et al.*, 2002). Cette étude supporte les observations à l'effet que l'inhibition de la p38 MAPK, et non pas les molécules ERK-1/2 MAPK, diminuerait de façon significative la production synergique d'IFN- γ chez les cellules NK.

La capacité des cellules NK à induire de façon synergique de l'IFN- γ lors d'une infection par le virus MHV3 et en présence d'IL-12/IL-18 serait limitée aux cellules NK myéloïdes ou spléniques mais non pas chez les cellules NK isolées du foie. Effectivement, bien qu'une induction d'IFN- γ ait été observée dans la population totale de MNCs intrahépatiques et que cette production d'IFN- γ ait été perdue lors de l'élimination des cellules NK par immunomagnétisme, la production synergique n'a pas été retrouvée dans la fraction purifiée de cellules NK intrahépatiques. Cette observation pourrait être expliquée par le fait que les cellules NK intrahépatiques vivent normalement dans un milieu très immunotolérant et que leur activation nécessite la participation d'autres cellules immunitaires. De plus, des études ont montré que les cellules NK réagissaient différemment à l'IL-12 et à l'IL-18 dépendamment de leur

localisation dans les tissus lymphoïdes (Pien *et al.*, 2000; Pien et Biron, 2000). Ainsi, les cellules NK fraîchement recrutées dans le foie pourraient être fonctionnelles, mais perdraient rapidement leur capacité à produire de l'IFN- γ lors de leur passage dans les sinusoides hépatiques. Cependant, il n'est pas exclu que cette perte de production d'IFN- γ soit également reliée à l'infection et l'apoptose de ces cellules NK.

La cytotoxicité des cellules NK *in vivo* semble importante dans le contrôle des hépatites virales. Lors d'une infection par le virus pathogène L2-MHV3, l'activité cytotoxique des cellules NK intrahépatiques est très élevée par rapport aux cellules NK myéloïdes et spléniques (Lehoux *et al.*, 2004). Effectivement, Stohlman *et al.* (1983) a montré que les cellules NK recrutées de la rate vers le foie, au cours d'une infection par le virus neurotrophique MHV-JHM, possédaient une forte activité cytotoxique, bien qu'elles ne fussent pas en mesure de produire de l'IFN- γ . Par contre, l'infection *in vitro* de ces cellules par le virus L2-MHV3 a plutôt montré la perte de la cytotoxicité cellulaire contre des cellules YAC-1. Effectivement, il est connu que l'activation du CEACAM1 à la surface des cellules NK inhibe l'activité cytotoxique de ces cellules (Markel *et al.*, 2004b). En conséquence, l'ajout des cytokines rIL-12 et rIL-18 a permis de contrer cette inhibition chez les cellules NK provenant de souris C57BL/6. Au contraire, l'activité cytotoxique des cellules NK provenant de souris *Ceacam1a*^{-/-} était difficilement induite par les rIL-12 et rIL-18. Ainsi, en plus de réguler l'activité cytotoxique des cellules NK, la molécule CEACAM1a serait impliquée dans le contrôle de l'activation de ces cellules par des cytokines pro-inflammatoires. Des résultats préliminaires, que nous avons obtenus, supportent ces hypothèses.

4.4- Les rôles de la molécule CEACAM1a lors d'une infection par un virus MHV

Il est connu que la liaison homophile des molécules CEACAM1 induit l'inhibition de l'activité cytotoxique des cellules NK (Watt *et al.*, 2001; Markel *et al.*, 2002a). Bien que les cellules NK recrutées au niveau du foie des souris infectées par le virus L2-MHV3 soient fortement cytotoxiques, la liaison de ce virus sur la molécule CEACAM1a n'induit aucune activité cytotoxique *in vitro*. Cependant, l'addition *in vitro*

d'IL-12/IL-18 à des cellules NK myéloïdes infectées par le virus L2-MHV3 restaure l'activité cytotoxique de ces cellules. Ces résultats suggèrent encore une fois que les cellules NK sont préalablement activées et perdent leurs fonctions à leur entrée dans le foie. Ainsi, il est possible que la présence de virus MHV3 et l'absence des IL-12 et IL-18 dans le foie des souris infectées rendraient les cellules NK inaptes à exercer leur fonction cytotoxique.

En plus d'être impliquée dans l'inhibition de la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK-T (Markel *et al.*, 2002b), la molécule CEACAM1a régulerait la production d'IFN- γ chez des cellules activées par les IL-12/IL-18 et infectées par le virus MHV3. En effet, l'absence de cette molécule ne favorise pas une sécrétion synergique d'IFN- γ entre le virus et les cytokines. Par ailleurs, bien qu'elle soit essentielle à l'induction de cette synergie, la molécule CEACAM1a jouerait subséquemment un rôle inhibiteur dans ce phénomène.

Peu d'études ont été réalisées sur le rôle des molécules CEACAM1 lors des réponses inflammatoires. L'incubation de cellules dendritiques avec l'anticorps spécifique AgB10 (anti-CEACAM1a) a favorisé la libération des IL-6 et IL-12 par ces cellules (Kammerer *et al.*, 2001). Par contre, nous avons montré que la molécule CEACAM1a n'était toutefois pas impliquée dans la production de l'IL-6 et du TNF- α par les macrophages péritonéaux lors de l'infection par le virus MHV3. Effectivement, aucune différence n'a été observée dans les niveaux de ces cytokines produites par les macrophages péritonéaux provenant de souris *Ceacam1a*^{-/-} et C57BL/6, infectées avec l'un ou l'autre des variants de pathogénicité MHV3. Sachant que le variant fortement atténué CL12-MHV3 n'infecte pas les cellules macrophagiques (Martin *et al.*, 1994) et que le variant non pathogène YAC-MHV3 se réplique plus lentement dans ces cellules (Lamontagne et Dupuy, 1987), il a été intéressant de noter, pour ces variants, des productions similaires d'IL-6 et de TNF- α à celles induites par le virus pathogène L2-MHV3. Ces productions de cytokines pro-inflammatoires seraient reliées à la capacité des variants MHV3 à se fixer aux molécules TLR2, tel que vérifié avec des macrophages péritonéaux provenant de souris *Tlr2*^{-/-} (observations préliminaires). Ainsi,

en plus de déterminer que la molécule CEACAM1a ne permettait pas l'induction de ces cytokines pro-inflammatoires, il a été possible d'établir que la réplication virale n'induisait pas la sécrétion d'IL-6 et de TNF- α par les macrophages péritonéaux, tel que montré avec des virus traités aux UV. Par ailleurs, les molécules de signalisation intracellulaires, telles que les MAPK et les facteurs nucléaires, seraient différemment activées en fonction de la présence et/ou de l'activation du récepteur au virus MHV3, la molécule CEACAM1a.

Le rôle essentiel de la molécule CEACAM1 comme récepteur reconnu des virus MHV est non seulement remis en question par nos résultats, mais aussi par des observations récentes sur la permissivité des souris *Ceacam1a*^{-/-} aux virus MHV. Ainsi, il a été clairement démontré que ces souris étaient totalement résistantes à une infection par le virus MHV-A59 (Hemmila *et al.*, 2004). Mais une étude très récente rapporte que le virus MHV-JHM, via sa glycoprotéine S, pourrait induire une infection indépendante du récepteur CEACAM1a dans le système neurocentral des souris *Ceacam1a*^{-/-} (Miura *et al.*, 2008). Ce phénomène serait attribué à la capacité du virus MHV-JHM de se propager entre les cellule-cibles sans l'aide du récepteur CEACAM1. En effet, des études *in vitro* ont permis de montrer que l'anticorps spécifique CC1 pouvait bloquer la propagation cellulaire du virus MHV-A59, mais pas du virus MHV-JHM (Nash et Buchmeier, 1996; Nakagaki *et al.*, 2005). Ainsi, la gravité de l'hépatite ou des problèmes neurologiques pourraient être associés à un mécanisme indépendant de la molécule CEACAM1a lors d'une infection par un MHV. De plus, la capacité des virus MHV à se propager dans les cellules-cibles serait un facteur déterminant de la maladie. Comme mentionné précédemment, le tropisme du MHV3 pour des cellules immunotolérantes, telles que les KC et LSEC, influencerait ce phénomène (Jacques *et al.*, 2008). Cependant, l'induction de la réponse inflammatoire n'est pas à négliger dans l'évolution de la maladie puisqu'elle est modulée indirectement par la permissivité des différentes cellules hépatiques, macrophagiques et/ou lymphoïdes à l'infection virale.

4.5- Importance des régions riches en héparanes sulfates et des TLRs durant une infection par un coronavirus

Les TLRs font partie de la classe des récepteurs impliqués dans la reconnaissance et l'activation de la réponse immunitaire innée (Athman et Philpott, 2004). Cette induction de la réponse immunitaire innée est basée sur la reconnaissance non clonale de constituants provenant de pathogènes appelés PAMPs. Ces PAMPs sont reconnus par différentes cellules du système immunitaire dont les cellules NK, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques (Mukhopadhyay *et al.*, 2004).

Nous avons démontré que la molécule TLR2 était impliquée lors de l'hépatite aiguë induite par le virus pathogène L2-MHV3 (chapitre 3.4). C'est la première fois que la fixation d'un coronavirus et sa pathogénèse sont directement associées à une molécule TLR. En effet, l'absence de ce récepteur chez des souris *Tlr2*^{-/-} a provoqué une diminution de la production des cytokines inflammatoires IL-6 et TNF- α au niveau du foie des souris infectées. Les observations histopathologiques ont montré une destruction cellulaire quasi absente chez les souris *Tlr2*^{-/-} infectées au contraire des souris C57BL/6. L'absence marquée d'atteinte hépatique chez les souris *Tlr2*^{-/-} infectées par le virus pathogène L2-MHV3 pourrait être due à une diminution importante de la production de cytokines pro-inflammatoires. En effet, les niveaux des IL-6 et TNF- α hépatiques semblent très bien corrélés avec les dommages tissulaires observés au cours de l'infection. Ces résultats suggèrent que l'activation de la réponse inflammatoire via la molécule TLR2 est un mécanisme important dans l'induction des lésions hépatiques. Par contre, l'absence de TLR2 n'empêche pas la réplication virale puisque les cellules provenant de souris *Tlr2*^{-/-} expriment le récepteur CEACAM1a. La réduction importante d'atteinte hépatique chez ces souris pourrait toutefois favoriser une meilleure survie, permettant le développement d'une réponse immune adaptative et l'élimination virale subséquente.

Il avait déjà été remarqué que les coronavirus murins générés suite à plusieurs passages *in vitro* pouvaient exprimer un tropisme élargi lié aux régions riches en héparanes sulfates plutôt qu'un tropisme spécifique au récepteur CEACAM1 (de Haan

et al., 2005). Ce tropisme pour les régions riches en héparanes sulfates pouvait être inhibé par un traitement à l'héparine, empêchant ainsi l'infection des cellules susceptibles par les virus MHV-A59 pouvant exprimer un tropisme élargi aux régions riches en héparanes sulfates (de Haan *et al.*, 2005). Comme le virus MHV-JHM peut induire une infection indépendante du récepteur CEACAM1a dans le système neurocentral des souris *Ceacam1a*^{-/-} (Miura *et al.*, 2008), il serait alors logique de penser que ce sérotype viral puisse utiliser les régions riches en héparanes sulfates pour se propager entre les cellule-cibles indépendamment du récepteur CEACAM1. Cependant, les études de Watanabe *et al.* (2007) ont montré que le virus MHV-JHM était en mesure d'interagir avec les régions riches en héparanes sulfates, mais que ces récepteurs ne permettaient pas l'internalisation du virus. L'infection des souris *Ceacam1a*^{-/-} par le virus MHV-JHM pourrait alors être attribuable au phénomène de fusion cellulaire via la protéine S (Lai et Cavanagh, 1997; Gallagher et Buchmeier, 2001; Nakagaki *et al.*, 2005) ou par l'intermédiaire d'un second récepteur tel qu'un TLR, plutôt que par une pénétration par endocytose.

Jusqu'à ce jour, certains virus ou constituants viraux ont été identifiés comme pouvant se fixer à des TLRs, associés ou non aux régions riches en héparanes sulfates. Le HSV-1 (Tiwari *et al.*, 2004), la protéine p17 du HIV (Poiesi *et al.*, 2007), la capside du HBV (Cooper *et al.*, 2005) et la protéine « core » du HCV (Dolganiuc *et al.*, 2004) sont connus pour se lier au TLR2 alors que le virus respiratoire syncytial reconnaît les récepteurs CD14/TLR4 (Kurt-Jones *et al.*, 2000; Haynes *et al.*, 2001). L'expression des TLRs au cours de certaines infections virales chroniques, dont le HCV, semble corrélée avec les niveaux sériques d'IL-6 et de TNF- α (Oyanagi *et al.*, 1999; Vidigal *et al.*, 2002; Lio *et al.*, 2003; Riordan *et al.*, 2006). L'expression des récepteurs TLR4 et TLR9 serait également augmentée lors d'une infection par le coronavirus du SARS et corrèlerait avec une dérégulation des cytokines, telle que l'augmentation de l'IL-6, expliquant la sévérité de la réponse inflammatoire induite au cours de cette infection (Okabayashi *et al.*, 2006). L'interaction du TLR7 avec l'ARN viral intracytoplasmique, provenant du MHV-A59 au cours de sa réplication, induirait la production d'IFN- α par les cellules dendritiques plasmacytoïdes et permettrait le contrôle de la réplication virale (Cervantes-

Barragan *et al.*, 2007). Quoique la fixation d'une protéine virale à un TLR ait été observée dans quelques infections virales, l'importance de cette fixation sur la réponse innée et l'état inflammatoire n'a pas été élucidée.

Dans le modèle de l'hépatite aiguë induite par le virus MHV3, nous avons aussi montré que la fixation du virus MHV3 à un TLR2 pouvait entraîner des effets sur la réponse innée. En fait, l'absence du récepteur TLR2 chez des souris knock-out influencerait les populations cellulaires résidentes et celles recrutées dans le foie lors de l'infection par le virus pathogène L2-MHV3. Effectivement, alors que les lymphocytes T $NK1.1^{-}CD4^{+}$ sont fortement augmentés dans le foie des souris C57BL/6 infectées par le virus L2-MHV3 après 96 heures d'infection (30%), aucune variation de ces cellules n'a été observée dans le foie des souris $Tlr2^{-/-}$ infectées par rapport aux souris $Tlr2^{-/-}$ contrôles. Au contraire, les cellules $NK1.1^{+}CD4^{-}CD8^{-}$ ont davantage augmenté chez les souris $Tlr2^{-/-}$ infectées (12,5%) que chez les souris C57BL/6 infectées (2,5%), par rapport aux souris contrôles respectives.

Ainsi, la fixation du virus MHV3 au récepteur TLR2 permettrait dans un premier temps d'augmenter la réponse inflammatoire induite par le virus pathogène L2-MHV3, responsable des dommages tissulaires hépatiques. Dans un second temps, la molécule TLR2 pourrait indirectement affecter les fonctions des cellules NK au niveau du foie, entraînant une défense antivirale innée déficiente. Les observations histologiques révèlent de faibles épanchements sanguins ou bris des sinusoides dans le foie de souris $Tlr2^{-/-}$, suggérant que les LSEC seraient épargnées au cours de l'infection par le virus pathogène L2-MHV3 chez ces souris knock-out. Cette protection des LSEC pourrait permettre une production adéquate des IL-12 et IL-18, favorisant la production synergique d'IFN- γ par les cellules NK, et de la PGE_2 , empêchant le phénomène de coagulation intravasculaire observé chez les souris susceptibles C57BL/6.

4.6- Intégration du modèle MHV3 en virologie et immunologie

Le virus MHV3 constitue un excellent modèle pour l'étude des désordres immunopathologiques induites par les infections virales aiguës ou chroniques associées ou non avec des immunodéficiences cellulaires. Le modèle du virus MHV3 devient très intéressant pour l'étude des infections induites par les coronavirus humains (SARS) car il permet d'identifier les mécanismes reliés aux hépatites virales de même qu'aux réponses inflammatoires.

Le modèle MHV3 a surtout permis de mettre en évidence deux nouveaux mécanismes viro-immunologiques : 1) la production synergique d'IFN- γ par les cellules NK en présence du virus MHV3 et des IL-12/IL-18 ainsi que; 2) l'implication des molécules TLR2 et des régions riches en héparanes sulfates dans l'induction de la réponse inflammatoire au cours de l'hépatite aiguë. D'un autre côté, le modèle MHV3 suggère un nouveau mécanisme d'évasion virale contre les cellules NK, soit l'implication des fonctions inhibitrices de la molécule CEACAM1a. En effet, la molécule CEACAM1a régule la production d'IFN- γ des cellules NK, pouvant alors diminuer l'efficacité antivirale de ces cellules lors de l'hépatite aiguë. Ce mécanisme d'évasion virale s'additionne aux autres mécanismes déjà publiés avec divers virus (revue par Orange *et al.*, 2002).

Le modèle MHV3 a permis de démontrer l'implication des cellules NK lors de la phase aiguë de l'hépatite virale. En effet, la survie et l'efficacité des fonctions des cellules NK semblent être primordiales dans le contrôle de l'infection virale. Dans le cas des hépatites virales humaines, il avait été montré que les cellules NK exerçaient un rôle antiviral très important (Chisari, 2000; McClary *et al.*, 2000; Guidotti et Chisari, 2001; Frese *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005a) et que les cytokines IL-12, IL-18 et IFN- γ contribuaient fortement à cette protection (Cavanaugh *et al.*, 1997; Jinushi *et al.*, 2003; Szkaradkiewicz *et al.*, 2005). Nos résultats suggèrent que l'administration des IL-12/IL-18 pourrait favoriser une production synergique d'IFN- γ par les cellules NK, inhibant également la réplication virale et créant une meilleure défense antivirale, tel que démontré par les études de Moreira *et al.* (2004). Ce mécanisme de protection antivirale,

par contre, nécessite une réplication virale et l'activation de la voie de signalisation impliquant principalement la molécule p38 MAPK.

La défense antivirale précoce contre les virus d'hépatites humaines dépend du recrutement et de l'activation des cellules NK dans le foie des patients infectés. Ces phénomènes sont toutefois sous la supervision des KC et des LSEC qui déterminent le recrutement des cellules inflammatoires dans le foie, via la sécrétion de chimiokines, et qui libèrent les cytokines pro-inflammatoires et immunosuppressives. L'utilisation de variants de pathogénicité MHV3 (Jacques *et al.*, 2008) de même que l'injection de PGE₂ chez des souris susceptibles au virus MHV3 (Abecassis *et al.*, 1987) ont mis en évidence le rôle des KC, LSEC et des cytokines immunosuppressives dans le contrôle des hépatites virales aiguës. Ainsi, le maintien de l'intégrité des LSEC et des KC chez des patients infectés par un virus d'hépatite serait bénéfique afin de favoriser un recrutement optimal des cellules NK au niveau du foie. De plus, l'injection des cytokines immunosuppressives IL-10, TGF- β et PGE₂ chez des patients en phase aiguë pourrait permettre de réduire la forte réponse inflammatoire induite au cours de l'infection.

L'administration des IL-12/IL-18 pourrait être utile dans la protection contre une infection virale au cours de la phase aiguë, surtout si ces cytokines sont diminuées durant les premiers jours d'infection. En effet, nous avons montré que les IL-12/IL-18 induisaient de façon synergique la production d'IFN- γ par les cellules NK durant le processus de réplication du virus MHV3. Il est probable que les molécules TLR3 ou TLR7, qui reconnaissent respectivement les ARNdb et ARNsb intracellulaires (Andersen *et al.*, 2006), soient aussi impliquées dans cette induction d'IFN- γ mais aucune observation ne permet de supporter actuellement cette hypothèse. De plus, la molécule CEACAM1a permettrait de contrôler le niveau d'IFN- γ produit par les cellules NK lors d'interactions homophiliques ou hétérophiliques. Ainsi, dépendamment de la réponse immunitaire induite au cours d'une infection par un virus à ADN ou ARN, il serait possible d'augmenter le niveau d'IFN- γ par la stimulation des récepteurs TLR3/TLR7 ou par l'administration des IL-12/IL-18. Au contraire, la production d'IFN- γ pourrait être diminuée par l'ajout d'inhibiteurs de TLR3/TLR7 ou en favorisant les

interactions entre molécules CEACAM1a. D'autre part, des études ont démontré que des agonistes de TLR3, TLR7, TLR7/8 et TLR9 pouvaient induire la production d'IFN de type 1 dont l'IFN- α (Averett *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2008). L'imiquimode, l'agoniste du TLR7, est déjà utilisé dans le traitement de divers problèmes de peau et lors d'infection par des papillomavirus. Des agonistes de TLR7/8, la resiquimode et l'imidazoquinoline, ont également fait leur preuve dans le traitement des infections induites par le HCV et le HSV-1 (Miller *et al.*, 2008).

Les résultats obtenus lors de l'infection des souris *Tlr2*^{-/-} avec le virus pathogène L2-MHV3 ont permis d'identifier un nouveau mécanisme d'amplification de la réponse inflammatoire menant à l'aggravation de l'hépatite aiguë. Effectivement, ces observations suggèrent que les virus enveloppés, tels que le SARS, les orthomyxovirus (virus de l'influenza) ou encore les herpèsvirus, pourraient induire une forte réponse inflammatoire en se fixant directement sur des TLRs et/ou des régions riches en héparanes sulfates via leurs protéines de surface, qu'elles soient membranaires ou libres. Dans cette optique, le récepteur spécifique reconnu au virus ou la réplication virale ne seraient pas nécessaires afin d'induire la forte réponse inflammatoire. Également, ce nouveau mécanisme pourrait être activé par des particules virales défectives, générées au cours de la réplication virale, ce qui augmenterait la réponse inflammatoire et l'aggravation de la maladie. Ces résultats ouvrent donc la voie vers l'étude de nouveaux PPRs viraux pouvant être impliqués dans la stimulation ou l'inhibition de la réponse immunitaire.

4.7- Perspectives futures

Le virus MHV3 est un excellent modèle pour l'étude des relations entre les populations cellulaires NK1.1⁺, T, B, LSEC et KC, les cytokines pro-inflammatoires et immunosuppressives et l'aggravation de l'hépatite. Sachant que l'apoptose des cellules NK pourrait être impliquée dans le niveau de l'hépatite aiguë induite par le virus MHV3, il serait intéressant de déterminer les mécanismes permettant une survie adéquate des

cellules NK, tels que l'action de la molécule CEACAM1a et des IL-15 et IL-18 sur les niveaux de Bcl-2 et des caspases impliquées dans le processus d'apoptose.

Le tropisme du virus MHV3 pour les LSEC et des KC semble déterminer l'état immunitaire du foie. Ainsi, il devient essentiel de pouvoir démontrer les déficits fonctionnels dus à la réplication virale chez des LSEC et KC purifiés *in vitro* sur le recrutement des populations cellulaires NK, NK-T et T CD4⁺ de même que sur la production des cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , IL-6 et TNF- α) et immunosuppressives (IL-4, IL-10, TGF- β et PGE₂). L'utilisation des variants de pathogénicité du MHV3 pourrait permettre de déterminer les effets protecteurs des différentes cytokines immunosuppressives en fonction de leur tropisme pour les LSEC ou les KC. De plus, l'infection de souris knock-out pour ces cytokines immunosuppressives pourrait permettre de cibler l'importance de ces cytokines dans la pathologie induite par les variants de pathogénicité du MHV3.

Aussi, les mécanismes impliqués dans les interactions entre la réplication du virus MHV3, la molécule CEACAM1a et les voies de signalisation induites par les IL-12/IL-18 dans la production synergique d'IFN- γ par les cellules NK devraient aussi être approfondis. En effet, les TLRs intracellulaires ou d'autres voies de signalisation pourraient potentiellement être impliqués dans l'induction d'une réponse synergique chez les cellules NK. Il serait important de déterminer si cette interaction est spécifique pour les IL-12/IL-18 ou pourrait aussi être induite par d'autres cytokines utilisant les mêmes voies de signalisation. Considérant également que les cellules NK provenant de souris *Ceacam1a*^{-/-} réagissent différemment à l'IL-12 et à l'IL-18 au niveau de leur activité cytotoxique, la maturation, l'activation et les fonctions des cellules NK *Ceacam1a*^{-/-} seraient intéressantes à vérifier.

Finalement, il serait important de vérifier l'implication de différents TLRs, des régions riches en héparanes sulfates et de la molécule CEACAM1a au niveau de l'induction, de la production et de la modulation des cytokines pro-inflammatoires et immunosuppressives sur des cellules hépatiques purifiées *in vitro* et infectées avec les différents variants de pathogénicité du MHV3. Fort de ces résultats, des expériences de

protection contre l'hépatite virale pourraient être effectuées *in vivo* par l'administration d'inhibiteurs de TLRs spécifiques en association ou non avec de l'héparine. L'infection de souris knock-out pour différents TLRs et knock-out pour les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α pourrait permettre également de cibler l'importance de ces récepteurs et de ces cytokines dans la pathologie induite par les variants de pathogénicité du MHV3.

Les résultats obtenus durant mes études doctorales ont ouvert la voie à de nouvelles avenues de recherche très originales et un fort potentiel de développement puisqu'il est possible d'envisager de pouvoir contrôler ou moduler les effets inflammatoires dommageables induits par les infections virales ne dépendant pas directement de la réplication virale et de la mort de la cellule infectée.

5- RÉFÉRENCES

- ABDEL-AZIZ, G., RESCAN, P. Y., CLEMENT, B., LEBEAU, G., RISSEL, M., GRIMAUD, J. A., CAMPION, J. P., et GUILLOUZO, A. 1991. Cellular sources of matrix proteins in experimentally induced cholestatic rat liver. *J. Pathol.* **164**: 167-174.
- ABECASSIS, M., FALK, J., DINZANS, V., LOPATIN, W., MAKOWKA, L., LEVY, G., et FALK, R. 1987. Prostaglandin E2 prevents fulminant hepatitis and the induction of procoagulant activity in susceptible animals. *Transplant. Proc.* **19**: 1103-1105.
- ABREU, M. T., VORA, P., FAURE, E., THOMAS, L. S., ARNOLD, E. T., et ARDITI, M. 2001. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **167**: 1609-1616.
- AJUEBOR, M. N., ASPINALL, A. I., ZHOU, F., LE, T., YANG, Y., URBANSKI, S. J., SIDOBRE, S., KRONENBERG, M., HOGABOAM, C. M., et SWAIN, M. G. 2005. Lack of chemokine receptor CCR5 promotes murine fulminant liver failure by preventing the apoptosis of activated CD1d-restricted NKT cells. *J. Immunol.* **174**: 8027-8037.
- AKPOLAT, N., YAHSI, S., GODEKMERDAN, A., DEMIRBAG, K., et YALNIZ, M. 2005. Relationship between serum cytokine levels and histopathological changes of liver in patients with hepatitis B. *World J. Gastroenterol.* **11**: 3260-3263.
- ALTER, M. J., GALLAGHER, M., MORRIS, T. T., MOYER, L. A., MEEKS, E. L., KRAWCZYNSKI, K., KIM, J. P., et MARGOLIS, H. S. 1997. Acute non-A-E hepatitis in the United States and the role of hepatitis G virus infection. *N. Engl. J. Med.* **336**: 741-746.
- AMARAA, R., MARECKOVA, H., URBANEK, P., et FUCIKOVA, T. 2002. Production of interleukins 10 and 12 by activated peripheral blood monocytes/macrophages in patients suffering from chronic hepatitis C virus infection

with respect to the response to interferon and ribavirin treatment. *Immunol. Lett.* **83**: 209-214.

- AN, S., CHEN, C. J., YU, X., LEIBOWITZ, J. L., et MAKINO, S. 1999. Induction of apoptosis in murine coronavirus-infected cultured cells and demonstration of E protein as an apoptosis inducer. *J. Virol.* **73**: 7853-7859.
- ANDERSEN, J. M., AL-KHAIRY, D., et INGALLS, R. R. 2006. Innate immunity at the mucosal surface: role of toll-like receptor 3 and toll-like receptor 9 in cervical epithelial cell responses to microbial pathogens. *Biol. Reprod.* **74**: 824-831.
- ARMANT, M., DELESPESE, G., et SARFATI, M. 1995. IL-2 and IL-7 but not IL-12 protect natural killer cells from death by apoptosis and up-regulate bcl-2 expression. *Immunology.* **85**: 331-337.
- ATHMAN, R., et PHILPOTT, D. 2004. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 25-32.
- AVERETT, D. R., FLETCHER, S. P., LI, W., WEBBER, S. E., et APPLEMAN, J. R. 2007. The pharmacology of endosomal TLR agonists in viral disease. *Biochem. Soc. Trans.* **35**: 1468-1472.
- AYADA, M., ISHIKAWA, T., OKUMURA, A., TANABE, J., ITO, H., OHASHI, T., MATSUMOTO, E., SATO, K., HOTTA, N., FUKUZAWA, Y., et KAKUMU, S. 2006. Alteration of serum cytokine balances among different phases of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol. Res.* **34**: 214-221.
- BACKHED, F., ROKBI, B., TORSTENSSON, E., ZHAO, Y., NILSSON, C., SEGUIN, D., NORMARK, S., BUCHAN, A. M., et RICHTER-DAHLFORS, A. 2003. Gastric mucosal recognition of *Helicobacter pylori* is independent of Toll-like receptor 4. *J. Infect. Dis.* **187**: 829-836.

- BADIZADEGAN, K., JONAS, M. M., OTT, M. J., NELSON, S. P., et PEREZ-ATAYDE, A. R. 1998. Histopathology of the liver in children with chronic hepatitis C viral infection. *Hepatology*. **28**: 1416-1423.
- BAIG, E., et FISH, E. N. 2008. Distinct signature type I interferon responses are determined by the infecting virus and the target cell. *Antivir. Ther.* **13**: 409-422.
- BANERJEE, S., NARAYANAN, K., MIZUTANI, T., et MAKINO, S. 2002. Murine coronavirus replication-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation promotes interleukin-6 production and virus replication in cultured cells. *J. Virol.* **76**: 5937-5948.
- BARNES, E., SALIO, M., CERUNDOLO, V., MEDLIN, J., MURPHY, S., DUSHEIKO, G., et KLENERMAN, P. 2004. Impact of alpha interferon and ribavirin on the function of maturing dendritic cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 3382-3389.
- BARR, D. P., BELZ, G. T., READING, P. C., WOJTASIAK, M., WHITNEY, P. G., HEATH, W. R., CARBONE, F. R., et BROOKS, A. G. 2007. A role for plasmacytoid dendritic cells in the rapid IL-18-dependent activation of NK cells following HSV-1 infection. *Eur. J. Immunol.* **37**: 1334-1342.
- BARRETT, S., COLLINS, M., KENNY, C., RYAN, E., KEANE, C. O., et CROWE, J. 2003. 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.* **71**: 212-218.
- BARTHOLD, S. W., et SMITH, A. L. 1987. Response of genetically susceptible and resistant mice to intranasal inoculation with mouse hepatitis virus JHM. *Virus Res.* **7**: 225-239.
- BEAUCHEMIN, N., DRABER, P., DVEKSLER, G., GOLD, P., GRAY-OWEN, S., GRUNERT, F., HAMMARSTROM, S., HOLMES, K. V., KARLSSON, A., KUROKI, M., LIN, S. H., LUCKA, L., NAJJAR, S. M., NEUMAIER, M., OBRINK,

- B., SHIVELY, J. E., SKUBITZ, K. M., STANNERS, C. P., THOMAS, P., THOMPSON, J. A., VIRJI, M., VON KLEIST, S., WAGENER, C., WATT, S., et ZIMMERMANN, W. 1999. Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp. Cell. Res.* **252**: 243-249.
- BEAUMONT, C., et CANONNE-HERGAUX, F. 2005. Erythrophagocytosis and recycling of heme iron in normal and pathological conditions; regulation by hepcidin. *Transfus. Clin. Biol.* **12**: 123-130.
 - BELYAVSKI, M., BELYAVSKAYA, E., LEVY, G. A., et LEIBOWITZ, J. L. 1998a. Coronavirus MHV3-induced apoptosis in macrophages. *Virology.* **250**: 41-49.
 - BELYAVSKI, M., LEVY, G. A., et LEIBOWITZ, J. L. 1998b. The pattern of induction of apoptosis during infection with MHV3 correlates with strain variation in resistance and susceptibility to lethal hepatitis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**: 619-625.
 - BENCHIMOL, S., FUKS, A., JOTHY, S., BEAUCHEMIN, N., SHIROTA, K., et STANNERS, C. P. 1989. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell.* **57**: 327-334.
 - BENDELAC, A. 1995. Mouse NK1+ T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 367-374.
 - BERRY, D. M., CRUICKSHANK, J. G., CHU, H. P., et WELLS, R. J. H. 1964. The structure of infectious bronchitis virus. *Virology.* **23**: 403-407.
 - BERTOLINO, P., TRESOL-BIÉMONT, M. C., RABOURDIN-COMBE, C. 1998. Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur. J. Immunol.* **28**: 221-36.
 - BHUNCHET, E., et WAKE, K. 1992. Role of mesenchymal cell populations in porcine serum-induced rat liver fibrosis. *Hepatology.* **16**: 1452-1473.
 - BIBURGER, M., et TIEGS, G. 2005. Alpha-galactosylceramide-induced liver injury in mice is mediated by TNF-alpha but independent of Kupffer cells. *J. Immunol.* **175**:1540-1550.

- BIRON, C. A., et BROSSAY, L. 2001. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr. Opin. Immunol.* **13**: 458-464.
- BISSELL, D. M., WANG, S. S., JARNAGIN, W. R., et ROLL, F. J. 1995. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J. Clin. Invest.* **96**: 447-455.
- BLACKBURN, S. D., WHERRY, E. J. 2007. IL-10, T cell exhaustion and viral persistence. *Trends Microbiol.* **15**: 143-146.
- BLUESTONE, J. A., et ABBAS, A. K. 2003. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 253-257.
- BOLACCHI, F., SINISTRO, A., CIAPRINI, C., DEMIN, F., CAPOZZI, M., CARDUCCI, F. C., DRAPEAU, C. M., ROCCHI, G., et BERGAMINI, A. 2006. Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clin. Exp. Immunol.* **144**: 188-196.
- BOOTH, C. M., MATUKAS, L. M., TOMLINSON, G. A., RACHLIS, A. R., ROSE, D. B., DWOSH, H. A., WALMSLEY, S. L., MAZZULLI, T., AVENDANO, M., DERKACH, P., EPHTIMIOS, I. E., KITAI, I., MEDERSKI, B. D., SHADOWITZ, S. B., GOLD, W. L., HAWRYLUCK, L. A., REA, E., CHENKIN, J. S., CESCONE, D. W., POUTANEN, S. M., et DETSKY, A. S. 2003. Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area. *JAMA.* **289**: 2801-2809.
- BOULTON, I. C. et GRAY-OWEN, S. D. 2002. Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes. *Nature Immunol.* **3**: 229-236.
- BRADY, J., HAYAKAWA, Y., SMYTH, M. J., et NUTT, S. L. 2004. IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *J. Immunol.* **172**: 2048-2058.

- BRIERLEY, I., BOUSNELL, M. E. G., BINNS, M. M., BILIMORIA, B., BLOK, V. C., BROWN, T. D., et INGLIS, S. C. 1987. An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV. *EMBO J.* **6**: 3779-3785.
- BRILLARD, E., PALLANDRE, J. R., CHALMERS, D., RYFFEL, B., RADLOVIC, A., SEILLES, E., ROHRLICH, P. S., PIVOT, X., TIBERGHEN, P., SAAS, P., et BORG, C. 2007. Natural killer cells prevent CD28-mediated FoxP3 transcription in CD4⁺CD25⁻ T lymphocytes. *Exp. Hematol.* **35**: 416-425.
- BRINTON, M. A., et NATHANSON, N. 1981. Genetic determinants of virus susceptibility: epidemiologic implication of murine models. *Epidemiol. Rev.* **3**: 115-139.
- BUDAGIAN, V., BULANOVA, E., PAUS, R., et BULFONE-PAUS, S. 2006. IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev.* **17**: 259-280.
- BUDT, M., CICHOCKA, I., REUTTER, W., et LUCKA, L. 2002. Clustering-induced signaling of CEACAM1 in PC12 cells. *Biol. Chem.* **383**: 803-812.
- BUKOWSKI, J. F., WODA, B. A., HABU, S., OKUMURA, K., et WELSH, R. M. 1983. NK1.1⁺ cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo. *J. Immunol.* **131**: 1531-1538.
- BUKOWSKI, J. F., WODA, B. A., et WELSH, R. M. 1984. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J. Virol.* **52**: 119-128.
- BYKOVSKAIA, S. N., BUFFO, M., ZHANG, H., BUNKER, M., LEVITT, M. L., AGHA, M., MARKS, S., EVANS, C., ELLIS, P., SHURIN, M. R., et SHOGAN, J. 1999. The generation of human dendritic and NK1.1⁺ cells from hemopoietic progenitors induced by interleukine-15. *J. Leuk. Biol.* **66**: 659-666.

- BYRNE, J. A., et OLDSTONE, M. B. A. 1985. Biology of cloned cytotoxic T lymphocytes specific for lymphocytic choriomeningitis virus: clearance of virus in vivo. *J. Virol.* **51**: 682-686.
- CADRANEL, J. F., CARON, C., COLLOT, G., VAN BATTEN, C., et DUMOUCHEL, P. 1999. Hepatitis B: epidemiology, natural history, biology, treatment monitoring. *Pathol. Biol.* **47**: 917-927.
- CAI, G., KASTELEIN, R. A., et HUNTER, C. A. 1999. IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18. *Eur. J. Immunol.* **29**: 2658-2665.
- CAMPBELL, J. J., QIN, S., UNUTMAZ, D., SOLER, D., MURPHY, K. E., HODGE, M. R., WU, L., et BUTCHER, E. C. 2001. Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J. Immunol.* **166**: 6477-6482.
- CARSON, W. E., FEHNIGER, T. A., HALDAR, S., ECKHERT, K., LINDEMANN, M. J., LAI, C. F., CROCE, C. M., BAUMANN, H., et CALIGIURI, M. A. 1997. A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J. Clin. Invest.* **99**: 937-943.
- CARSON, W. E., GIRI, J. G., LINDEMANN, M. J., LINETT, M. L., AHDIEH, M., PAXTON, R., ANDERSON, D., EISENMANN, J., GRABSTEIN, K., et CALIGIURI, M. A. 1994. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J. Exp. Med.* **180**: 1395-1403.
- CASTILLETTI, C., BORDI, L., LALLE, E., ROZERA, G., POCCIA, F., AGRATI, C., ABBATE, I., et CAPOBIANCHI, M. R. 2005. Coordinate induction of IFN-alpha and -gamma by SARS-CoV also in the absence of virus replication. *Virology.* **341**: 163-169.

- CAVANAGH, D., BRIAN, D. A., BRITON, P., ENJUANES, L., HORZINEK, M. C., LAI, M. M. C., LAUDE, H., PLAGEMANN, P. G. W., SIDDELL, S., SPAAN, W., et TALBOT, P. J. 1997. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch. Virol.* **145**: 629-635.
- CAVANAGH, D., et HORZINEK, M. C. 1993. Genus Torovirus assigned to the Coronaviridae [news]. *Arch. Virol.* **128**: 395-396.
- CAVANAUGH, V. J., GUIDOTTI, L. G., et CHISARI, F. V. 1997. Interleukin-12 inhibits hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J. Virol.* **71**: 3236-3243.
- CERVANTES-BARRAGAN, L., ZUST, R., WEBER, F., SPIEGEL, M., LANG, K. S., AKIRA, S., THIEL, V., et LUDEWIG, B. 2007. Control of coronavirus infection through plasmacytoid dendritic-cell-derived type I interferon. *Blood.* **109**: 1131-1137.
- CHEN, C. J., LIN, T. T., et SHIVELY, J. E. 1996. Role of interferon regulatory factor-1 in the induction of biliary glycoprotein (cell CAM-1) by interferon-gamma. *J. Biol. Chem.* **271**: 28181-28188.
- CHEN, G., FU, Z. R., WANG, L. H., et JIAO, B. H. 2005. The effect of hIL-4 on the expression of E-selectin and ICAM-1 on bovine aortic endothelial cells. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* **21**: 775-777.
- CHEN, T., ZIMMERMANN, W., PARKER, J., CHEN, I., MAEDA, A., et BOLLAND, S. 2001. Biliary glycoprotein (BGP_a, CD66_a, CEACAM1) mediates inhibitory signals. *J. Leukoc. Biol.* **70**: 335-340.
- CHEN, Y., WEI, H., GAO, B., HU, Z., ZHENG, S., et TIAN, Z. 2005a. Activation and function of hepatic NK cells in hepatitis B infection: an underinvestigated innate immune response. *J. Viral Hepat.* **12**: 38-45.
- CHENG, A. S., CHAN, H. L., TO, K. F., LEUNG, W. K., CHAN, K. K., LIEW, C. T., et SUNG, J. J. 2004. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* **24**: 853-860.

- CHEUNG, C. Y., POON, L. L., NG, I. H., LUK, W., SIA, S. F., WU, M. H., CHAN, K. H., YUEN, K. Y., GORDON, S., GUAN, Y., et PEIRIS, J. S. 2005. Cytokine responses in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected macrophages in vitro: possible relevance to pathogenesis. *J. Virol.* **79**: 7819-7826.
- CHEUNG, R. C., et KEEFFE, E. B. 1997. Hepatitis G virus: clinical relevance and responsiveness to interferon. *Am. J. Gastroenterol.* **92**: 1957-1959.
- CHEUNG, R. C., KEEFFE, E. B., et GREENBERG, H. B. 1997. Hepatitis G virus: is it a hepatitis virus? *West. J. Med.* **167**: 23-33.
- CHINI, C. C., BOOS, M. D., DICK, C. J., SCHOON, R. A., et LEIBSON, P. J. 2000. Regulation of p38 mitogen-activated protein kinase during NK cell activation. *Eur. J. Immunol.* **30**: 2791-2798.
- CHISARI, F. V. 2000. Viruses, immunity and cancer: lessons from hepatitis B. *Am. J. Pathol.* **156**: 1117-1132.
- CHISARI, F. V., et FERRARI, C. 1995. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* **13**: 29-60.
- CHOI, K., AIZAKI, H. et LAI, M. M. 2005. Murine coronavirus requires lipid rafts for virus entry and cell-cell fusion but not for virus release. *J. Virol.* **79**: 9862-9871.
- CHOU, Y. C., CHEN, M. L., HU, C. P., CHEN, Y. L., CHONG, C. L., TSAI, Y. L., LIU, T. L., JENG, K. S., et CHANG, C. 2007. Transforming growth factor-beta1 suppresses hepatitis B virus replication primarily through transcriptional inhibition of pregenomic RNA. *Hepatology.* **46**: 672-681.
- CLASPER, S., VEKEMANS, S., FIORE, M., PLEBANSKI, M., WORDSWORTH, P., DAVID, G., et JACKSON, D. G. 1999. Inducible expression of the cell surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 (fibroglycan) on human activated macrophages can regulate fibroblast growth factor action. *J. Biol. Chem.* **274**: 24113-24123.

- COLONNA, M. 1997. Immunoglobulin superfamily inhibitory receptors: from natural killer cells to antigen-presenting cells. *Res. Immunol.* **148**: 169-171.
- COMPTON, S. R., BARTHOLD, S. W., et SMITH, A. L. 1993. The cell and molecular pathogenesis of coronaviruses. *Lab. Anim. Sci.* **43**: 15-28.
- COMPTON, T., KURT-JONES, E. A., BOEHME, K. W., BELKO, J., LATZ, E., GOLENBOCK, D. T., et FINBERG, R. W. 2003. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J. Virol.* **77**: 4588-4596.
- COOLEY, S., XIAO, F., PITT, M., GLEASON, M., MCCULLAR, V., BERGEMANN, T. L., MCQUEEN, K. L., GUETHLEIN, L. A., PARHAM, P., et MILLER, J. S. 2007. A subpopulation of human peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self-MHC is developmentally immature. *Blood.* **110**: 578-586.
- COOPER, A., TAL, G., LIDER, O., et SHAUL, Y. 2005. Cytokine induction by the hepatitis B virus capsid in macrophages is facilitated by membrane heparan sulfate and involves TLR2. *J. Immunol.* **175**: 3165-3176.
- COOPER, M. A., BUSH, J. E., FEHNIGER, T. A., VANDEUSEN, J. B., WAITE, R. E., LIU, Y., AGUILA, H. L., et CALIGIURI, M. A. 2002. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood.* **100**: 3633-3638.
- CORSE, E., et MACHAMER, C. E. 2002. The cytoplasmic tail of infectious bronchitis virus E protein directs Golgi targeting. *J. Virol.* **76**: 1273-1284.
- COUTELIER, J. P, GODFRAIND, C., DVEKSLER, G. S., WYSOCKA, M., CARDELLICHIO, C. B., NOEL, H., et HOLMES, K. V. 1994. B lymphocyte and macrophage expression of carcinoembryonic antigen-related adhesion molecules that serve as receptors for murine coronavirus. *Eur. J. Immunol.* **24**: 1383-1390.

- CRISPE, I. N. 2003. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 51-62.
- CROTTA, S., STILLA, A., WACK, A., D'ANDREA, A., NUTI, S., D'ORO, U., MOSCA, M., FILLIPONI, F., BRUNETTO, R. M., BONINO, F., ABRIGNANI, S., et VALIANTE, N. M. 2002. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J. Exp. Med.* **195**: 35-41.
- CUI, J., SHIN, T., KAWANO, T., SATO, H., KONDO, E., TOURA, I., KANEKO, Y., KOSEKI, H., KANNO, M., et TANIGUCHI, M. 1997. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science.* **278**: 1623-1626.
- D'ADDARIO, M., AHMAD, A., MORGAN, A., et MENEZES, J. 2000. Binding of the Epstein-Barr virus major envelope glycoprotein gp350 results in the upregulation of the TNF-alpha gene expression in monocytic cells via NF-kappaB involving PKC, PI3-K and tyrosine kinases. *J. Mol. Biol.* **298**: 765-778.
- D'AMICO, G., FRASCAROLI, G., BIANCHI, G., TRANSIDICO, P., DONI, A., VECCHI, A., SOZZANI, S., ALLAVENA, P., et MANTOVANI, A. 2000. Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys. *Nat. Immunol.* **1**: 387-391.
- DANDEKAR, A. A., et PERLMAN, S. 2005. Immunopathogenesis of coronavirus infections: implications for SARS. *Nat. Rev. Immunol.* **5**: 917-927.
- D'ANDREA, A., MA, X., ASTE-AMEZAGA, M., PAGANIN, C., et TRINCHIERI, G. 1995. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *J. Exp. Med.* **181**: 537-546.
- DANIELS, E., LETOURNEAU, S., TURBIDE, C., KUPRINA, N., RUDINSKAYA, T., YAZOVA, A. C., HOLMES, K. V., DVEKSLER, G. S., et BEAUCHEMIN, N. 1996. Biliary glycoprotein 1 expression during embryogenesis: correlation with

events of epithelial differentiation, mesenchymal-epithelial interactions, absorption, and myogenesis. *Dev. Dyn.* **206**: 272-290.

- DAO, T., MEHAL, W. Z., et CRISPE, N. 1998. IL-18 augments perforin-dependent cytotoxicity of liver NK-T cells. *J. Immunol.* **161**: 2217-2222.
- DE ALBUQUERQUE, N., BAIG, E., MA, X., ZHANG, J., HE, W., ROWE, A., HABAL, M., LIU, M., SHALEV, I., DOWNEY, G. P., GORCZYNSKI, R., BUTANY, J., LEIBOWITZ, J., WEISS, S. R., MCGILVRAY, I. D., PHILLIPS, M. J., FISH, E. N., et LEVY, G. A. 2006. Murine hepatitis virus strain 1 produces a clinically relevant model of severe acute respiratory syndrome in A/J mice. *J. Virol.* **80**: 10382-10394.
- DE HAAN, C. A., LI, Z., TE LINTELO, E., BOSCH, B. J., HAIJEMA, B. J., et ROTTIER, P. J. 2005. Murine coronavirus with an extended host range uses heparan sulfate as an entry receptor. *J. Virol.* **79**: 14451-14456.
- DE HAAN, C. A., MASTERS, P. S., SHEN, X., WEISS, S., et ROTTIER, P. J. 2002. The group-specific murine coronavirus genes are not essential, but their deletion by reverse genetics, is attenuated in the natural host. *Virology.* **296**: 177-189.
- DE HAAN, C. A., et ROTTIER, P. J. 2005. Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **64**: 165-230.
- DE HAAN, C. A., SMEETS, M., VERNOOIJ, F., VENNEMA, H., et ROTTIER, P. J. 1999. Mapping of the coronavirus membrane protein domains involved in interaction with the spike protein. *J. Virol.* **73**: 7441-7452.
- DE HAAN, C. A., TE LINTELO, E., LI, Z., RAABEN, M., WURDINGER, T., BOSCH, B. J., et ROTTIER, P. J. 2006. Cooperative involvement of the S1 and S2 subunits of the murine coronavirus spike protein in receptor binding and extended host range. *J. Virol.* **80**: 10909-10918.

- DING, X. M., XUE, W. J., JI, Z. Z., et TIAN, P. X. 2007. Infusion of donor hepatic non-parenchymal cells prolongs survival of skin allografts in mice: role of microchimerism and IL-4. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* **6**: 34-37.
- DOHERTY, D. G., et O'FARRELLY, C. 2000. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol. Rev.* **174**: 5-20.
- DOLGANIUC, A., NORKINA, O., KODYS, K., CATALANO, D., BAKIS, G., MARSHALL, C., MANDREKAR, P., et SZABO, G. 2007. Viral and host factors induce macrophage activation and loss of toll-like receptor tolerance in chronic HCV infection. *Gastroenterology.* **133**: 1627-1636.
- DOLGANIUC, A., OAK, S., KODYS, K., GOLENBOCK, D. T., FINBERG, R. W., KURT-JONES, E., et SZABO, G. 2004. Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology.* **127**: 1513-1524.
- DONDA, A., MORI, L., SHAMSHIEV, A., CARENA, I., MOTTET, C., HEIM, M. H., BEGLINGER, C., GRUNERT, F., ROCHLITZ, C., TERRACCIANO, L., JANTSCHIEFF, P., et DELIBERO, G. 2000. Locally inducible CD66a (CEACAM1) as an amplifier of the human intestinal T cell response. *Eur. J. Immunol.* **30**: 2593-2603.
- DONG, Z., WEI, H., SUN, R., HU, Z., GAO, B., et TIAN, Z. 2004. Involvement of natural killer cells in PolyI:C-induced liver injury. *J. Hepatol.* **41**: 966-973.
- DONG, Z., WEI, H., SUN, R., et TIAN, Z. 2007. The roles of innate immune cells in liver injury and regeneration. *Cell. Mol. Immunol.* **4**: 241-252.
- DROSTEN, C., GUNTHER, S., PREISER, W., VAN DER WERF, S., BRODT, H. R., BECKER, S., RABENAU, H., PANNING, M., KOLESNIKOVA, L., FOUCHIER, R. A., BERGER, A., BURGUIERE, A. M., CINATL, J., EICKMANN, M., ESCIOU, N., GRYWNA, K., KRAMME, S., MANUGUERRA, J. C., MULLER, S., RICKERTS, V., STURMER, M., VIETH, S., KLENK, H. D., OSTERHAUS, A.

- D., SCHMITZ, H., et DOERR, H. W. 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**: 1967-1976.
- DUBOIS-DALCQ, M., DOLLER, E., HASPEL, M., et HOLMES, K. V. 1982. Cell tropism and expression of mouse hepatitis viruses (MHV) in mouse spinal cord cultures. *Virology.* **119**: 317-331.
 - DUPUY, J. M., LEVY-LEBLOND, E., et LE PREVOST, C. 1975. Immunopathology of mouse hepatitis virus type 3 infection. II. Effect of immunosuppression in resistant mice. *J. Immunol.* **114**: 226-230.
 - DUPUY, J. M., et RODRIGUE, D. 1981. Heterogeneity in evolutive patterns of inbred mice infected with a cloned substrain of mouse hepatitis virus type 3. *Intervirology.* **16**: 114-117.
 - DVEKSLER, G. S., PENSIERO, M. N., CARDELLICHIO, C. B., WILLIAMS, R. K., JIANG, G. S., HOLMES, K. V., et DIEFFENBACH, C. W. 1991. Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV. *J. Virol.* **65**: 6881-6891.
 - EDLUND, M., BLIKSTAD, I., et OBRINK, B. 1996. Calmodulin binds to specific sequences in the cytoplasmic domain of C-CAM and down-regulates C-CAM self-association. *J. Biol. Chem.* **271**: 1393-1399.
 - EDMINSTON, K. H., GANGOPADHYAY, A., SHOJI, Y., NACHMAN, A. P., THOMAS, P., et JESSUP, J. M. 1997. In vivo induction of murine cytokine production by carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* **57**: 4432-4436.
 - EISEN-VANDERVELDE, A. L., WAGGONER, S. N., YAO, Z. Q., CALE, E. M., HAHN, C. S., et HAHN, Y. S. 2004b. Hepatitis C virus core selectively suppresses interleukin-12 synthesis in human macrophages by interfering with AP-1 activation. *J. Biol. Chem.* **279**: 43479-43486.
 - EISEN-VANDERVELDE, A. L., YAO, Z. Q., et HAHN, Y. S. 2004a. The molecular basis of HCV-mediated immune dysregulation. *Clin. Immunol.* **111**: 16-21.

- EMOTO, M., MITTRUCKER, H. W., SCHMITS, R., MAK, T. W., et KAUFMANN, S. H. 1999. Critical role of leukocyte function-associated antigen-1 in liver accumulation of CD4+NKT cells. *J. Immunol.* **162**: 5094-5098.
- EMOTO, M., MIYAMOTO, M., NAMBA, K., SCHMITS, R., VAN ROOIJEN, N., KITA, E., et KAUFMANN, S. H. 2000. Participation of leukocyte function-associated antigen-1 and NK cells in the homing of thymic CD8+NKT cells to the liver. *Eur. J. Immunol.* **30**: 3049-3056.
- ERGUN, S., KILIK, N., ZIEGELER, G., HANSEN, A., NOLLAU, P., GOTZE, J., WURMBACH, J. H., HORST, A., WEIL, J., FERNANDO, M., et WAGENER, C. 2000. CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol. Cell.* **5**: 311-320.
- ERHARDT, A., BIBURGER, M., PAPADOPOULOS, T., et TIEGS, G. 2007. IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice. *Hepatology.* **45**: 475-485.
- ESKO, J. D., et SELLECK, S. B. 2002. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 435-471.
- EXLEY, M. A., HE, Q., CHENG, O., WANG, R. J., CHENEY, C. P., BALK, S. P., et KOZIEL, M. J. 2002. Cutting edge: Compartmentalization of Th1-like noninvariant CD1d-reactive T cells in hepatitis C virus-infected liver. *J. Immunol.* **168**: 1519-1523.
- FAHLGREN, A., BARANOV, V., FRANGSMYR, L., ZOUBIR, F., HAMMARSTROM, M. L., et HAMMARSTROM, S. 2003. Interferon-gamma tempers the expression of carcinoembryonic antigen family molecules in human colon cells: a possible role in innate mucosal defence. *Scand. J. Immunol.* **58**: 628-641.

- FAINBOIM, L., CHERNAVSKY, A., PALADINO, N., FLORES, A., et ARRUVITO, L. 2007. Cytokines and chronic liver disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* **18**: 143-157.
- FALASCA, K., UCCIFERRI, C., DALESSANDRO, M., ZINGARIELLO, P., MANCINO, P., PETRARCA, C., PIZZIGALLO, E., CONTI, P., et VECCHIET, J. 2006. Cytokine patterns correlate with liver damage in patients with chronic hepatitis B and C. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **36**: 144-150.
- FERNANDEZ, N. C., TREINER, E., VANCE, R. E., JAMIESON, A. M., LEMIEUX, S., et RAULET, D. H. 2005. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood.* **105**: 4416-4423.
- FERNANDEZ-BOTRAN, R., YAN, J., et JUSTUS, D. E. 1999. Binding of interferon gamma by glycosaminoglycans: a strategy for localization and/or inhibition of its activity. *Cytokine.* **11**: 313-325.
- FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., et HOWLEY, P. M. 2007. *Fields's virology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphie.
- FILICE, G. A. 1988. Antimicrobial properties of Kupffer cells. *Infect. Immun.* **56**: 1430-1435.
- FITZGERALD, K. A., PALSSON-MCDERMOTT, E. M., BOWIE, A. G., JEFFERIES, C. A., MANSELL, A. S., BRADY, G., BRINT, E., DUNNE, A., GRAY, P., HARTE, M. T., MCMURRAY, D., SMITH, D. E., SIMS, J. E., BIRD, T. A., et O'NEILL, L. A. 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature.* **413**: 78-83.
- FONTENOT, J. D., GAVIN, M. A., et RUDENSKY, A. Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**: 330-336.

- FOURNES, B., SADEKOVA, S., TURBIDE, C., LETOURNEAU, S., et BEAUCHEMIN, N. 2001. The CEACAM1-L Ser503 residue is crucial for inhibition of colon cancer cell tumorigenicity. *Oncogene*. **20**: 219-230.
- FRASER, C. M., BERGERON, J. A., MAYS, A., et AIELLO, S. E. 1996. Manuel Vétérinaire Merck. 1^{re} édition française de la 7^{ème} édition du Merck Veterinary Manual. Merck & Co. Inc. New Jersey (USA). 1625 pages.
- FRESE, M., SCHWARZLE, V., BARTH, K., KRIEGER, N., LOHMANN, V., MIHM, S., HALLER, O., et BARTENSCHLAGER, R. 2002. Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology*. **35**: 694-703.
- FREUD, A. G., et CALIGIURI, M. A. 2006. Human natural killer cell development. *Immunol. Rev.* **214**: 56-72.
- FRIEDMAN, S. L. 1993. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N. Engl. J. Med.* **328**: 1828-1835.
- FRINK, M., HSIEH, Y. C., THOBE, B. M., CHOUDHRY, M. A., SCHWACHA, M. G., BLAND, K. I., et CHAUDRY, I. H. 2007. TLR4 regulates Kupffer cell chemokine production, systemic inflammation and lung neutrophil infiltration following trauma-hemorrhage. *Mol. Immunol.* **44**: 2625-2630.
- GALLAGHER, T. M., et BUCHMEIER, M. J. 2001. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology*. **279**: 371-374.
- GALLAGHER, T. M., ESCARMIS, C., et BUCHMEIER, M. J. 1991. Alteration of the pH dependence of coronavirus-induced cell fusion: effect of mutations in the spike glycoprotein. *J. Virol.* **65**: 1916-1928.
- GANGOPADHYAY, A., LAZURE, D. A., et THOMAS, P. 1997. Carcinoembryonic antigen induces signal transduction in Kupffer cells. *Cancer Lett.* **118**: 1-6.

- GANSUVD, B., HAGIHARA, M., YU, Y., INOUE, H., UEDA, Y., TSUCHIYA, T., MASUI, A., ANDO, K., NAKAMURA, Y., MUNKHTUVSHIN, N., KATO, S., THOMAS, J. M., et HOTTA, T. 2002. Human umbilical cord blood NK T cells kill tumors by multiple cytotoxic mechanisms. *Human Immunol.* **63**: 164-175.
- GATELY, M. K., RENZETTI, L. M., MAGRAM, J., STERN, A. S., ADORINI, L., GUBLER, U., et PRESKY, D. H. 1998. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**: 495-521.
- GERDES, N., SUKHOVA, G. K., LIBBY, P., REYNOLDS, R. S., YOUNG, J. L., et SCHONBECK, U. 2002. Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis. *J. Exp. Med.* **195**: 245-257.
- GERNA, G., PASSARANI, N., BATTAGLIA, M., et RONDANELLI, E. G. 1985. Human enteric coronaviruses: antigenic relatedness to human coronavirus OC43 and possible etiologic role in viral gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* **151**: 796-803.
- GHEORGHIU, M., BARA, C., PASARICA, D., BASOVEANU, L., BLEOTU, C., TOPARCEANU, F., TRANDAFIR, T., et DIACONU, C. C. 2004. Ethanol-induced dysfunction of hepatocytes and leukocytes in patients without liver failure. *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* **63**: 5-33.
- GHOSH, S., MAY, M. J., et KOPP, E. B. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**: 225-260.
- GILLCRIST, J. A. 1999. Hepatitis viruses A, B, C, D, E and G: implications for dental personnel. *J. Am. Dent. Assoc.* **130**: 509-520.
- GIROUX, M., et DENIS, F. 2005. CD1d-unrestricted human NK-T cells release chemokines upon Fas engagement. *Blood.* **105**: 703-710.

- GODFRAIND, C., et COUTELIER, J. P. 1998. Morphological analysis of mouse hepatitis virus A59-induced pathology with regard to viral receptor expression. *Histol. Histopathol.* **13**: 181-199.
- GODFRAIND, C., HOLMES, K. V., et COUTELIER, J. P. 1995a. Thymus involution induced by mouse hepatitis virus A59 in BALB/c mice. *J. Virol.* **69**: 6541-6547.
- GODFRAIND, C., KILGRETH, S. G., CARDELLICCHIO, C. B., KNOBLER, R., COUTELIER, J. P., DUBOIS-DALCQ, M., et HOLMES, K. V. 1995b. Tissue and cellular distribution of an adhesion molecule in the carcinoembryonic antigen family that serves as receptor for mouse hepatitis virus. *Lab. Invest.* **73**: 615-627.
- GODFREY, D. I., et KRONENBERG, M. 2004. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J. Clin. Invest.* **114**: 1379-1388.
- GOLDEN-MASON, L., et ROSEN, H. R. 2006. Natural Killer cells: primary target for hepatitis C virus immune evasion strategies. *Liver Transpl.* **12**: 363-372.
- GOSSELIN, J., TOMOIU, A., GALLO, R. C., et FLAMAND, L. 1999. Interleukine-15 as an activator of natural killer cell-mediated antiviral response. *Blood.* **94**: 4210-4219.
- GOTTE, M. 2003. Syndecans in inflammation. *FASEB J.* **17**: 575-591.
- GRAY-OWEN, S. D., et BLUMBERG, R. 2006. CEACAM1: contact-dependant control of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **6**: 433-446.
- GREICIUS, G., SEVERINSON, E., BEAUCHEMIN, N., OBRINK, B., et SINGER, B. B. 2003. CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex-induced activation. *J. Leukoc. Biol.* **74**: 126-134.
- GUIDOTTI, L. G., et CHISARI, F. V. 2001. Non cytolytic control of viral infections by the innate and adaptative immune response. *Annu. Rev. Immunol.* **19**: 65-91.

- GUTIERREZ-REYES, G., GUTIERREZ-RUIZ, M. C., et KERSHENOBICH, D. 2007. Liver fibrosis and chronic viral hepatitis. *Arch. Med. Res.* **38**: 644-651.
- HAMMOND, K., CAIN, W., VAN DRIEL, I., et GODFREY, D. 1998. Three day neonatal thymectomy selectively depletes NK1.1+ T cells. *Int. Immunol.* **10**: 1491-1499.
- HAMMOND, K. J., PELIKAN, S. B., CROWE, N. Y., RANDLE-BARRET, E., NAKAYAMA, T., TANIQUCHI, M., SMYTH, M. J., VAN DRIEL, I. R., SCOLLAY, R., BAXTER, A. G., et GODFREY, D. I. 1999. NK-T cells are phenotypically and functionally diverse. *Eur. J. Immunol.* **29**: 3768-3781.
- HAMRE, D., et PROCKNOW, J. J. 1966. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **121**: 190-193.
- HARBER, M., SUNDSTEDT, A., et WRAITH, D. 2000. The role of cytokines in immunological tolerance: potential for therapy. *Expert Rev. Mol. Med.* **2**: 1-20.
- HASHIMOTO, W., OSAKI, T., OKAMURA, H., ROBBINS, P. D., KURIMOTO, M., NAGATA, S., LOTZE, M. T., et TAHARA, H. 1999. Differential antitumor effects of administration of recombinant IL-18 or recombinant IL-12 are mediated primarily by Fas-Fas ligand- and perforin-induced tumor apoptosis, respectively. *J. Immunol.* **163**: 583-589.
- HAYNES, L. M., MOORE, D. D., KURT-JONES, E. A., FINBERG, R. W., ANDERSON, L. J., et TRIPP, R. A. 2001. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **75**: 10730-10737.
- HEMMILA, E., TURBIDE, C., OLSON, M., JOTHY, S., HOLMES, K. V., et BEAUCHEMIN, N. 2004. *Ceacam1a* *-/-* mice are completely resistant to infection by murine coronavirus mouse hepatitis virus A59. *J. Virol.* **78**: 10156-10165.
- HERBERMAN, R. B. 1982. NK1.1+ cells and other natural effector cells. Academic Press, New York.

- HERZER, K., FALK, C. S., ENCKE, J., EICHORST, S. T., ULSENHEIMER, A., SELIGER, B., et KRAMMER, P. H. 2003. Upregulation of major histocompatibility complex class I on liver cells by hepatitis C virus core protein via p53 and TAP1 impairs natural killer cell cytotoxicity. *J. Virol.* **77**: 8299-8309.
- HIGASHI, N., FUJIOKA, K., DENDA-NAGAI, K., HASHIMOTO, S., NAGAI, S., SATO, T., FUJITA, Y., MORIKAWA, A., TSUIJI, M., MIYATA-TAKEUCHI, M., SANO, Y., SUZUKI, N., YAMAMOTO, K., MATSUSHIMA, K., et IRIMURA, T. 2002. The macrophage C-type lectin specific for galactose/N-acetylgalactosamine is an endocytic receptor expressed on monocyte-derived immature dendritic cells. *J. Biol. Chem.* **277**: 20686-20693.
- HOLMES, K. V., DOLLER, E. W., et STURMAN, L. S. 1981. Tunicamycin-resistant glycosylation of coronavirus glycoprotein: demonstration of a novel type of viral glycoprotein. *Virology.* **115**: 334-344.
- HOLZ, L. E., MCCAUGHAN, G. W., BENSELER, V., BERTOLINO, P., et BOWEN, D. G. 2008. Liver tolerance and the manipulation of immune outcomes. *Inflamm. Allergy Drug Targets.* **7**: 6-18.
- HORNG, T., BARTON, G. M., FLAVELL, R. A., et MEDZHITOV, R. 2002. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature.* **420**: 329-333.
- HORNG, T., BARTON, G. M., et MEDZHITOV, R. 2001. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.* **2**: 835-841.
- HORST, A. K., ITO, W. D., DABELSTEIN, J., SCHUMACHER, U., SANDER, H., TURBIDE, C., BRUMMER, J., MEINERTZ, T., BEAUCHEMIN, N., et WAGENER, C. 2006. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates vascular remodeling in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* **116**: 1596-1605.

- HORZINEK, M. C., FLEWETT, T. H., SAIF, L. J., SPAAN, W. J., WEISS, M., et WOODE, G. N. 1987. A new family of vertebrate viruses: Toroviridae. *Intervirology*. **27**: 17-24.
- 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., et OMATA, M. 2005. Hepatitis C virus core protein and hepatitis activity are associated through transactivation of interleukin-8. *J. Infect. Dis.* **192**: 266-275.
- HUANG, K. J., SU, I. J., THERON, M., WU, Y. C., LAI, S. K., LIU, C. C., et LEI, H. Y. 2005. An interferon-gamma-related cytokine storm in SARS patients. *J. Med. Virol.* **75**: 185-194.
- HUBER, M., IZZI, L., GRONDIN, P., HOUDE, C., KUNATH, T., VEILLETTE, A., et BEAUCHEMIN, N. 1999. The carboxyl-terminal region of biliary glycoprotein controls its tyrosine phosphorylation and association with protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **274**: 335-344.
- HYMAN, A., YIM, C., KRAJDEN, M., READ, S., BASINSKI, A. S., WANLESS, I., LEVY, G., et HEATHCOTE, J. 1999. Oral prostaglandin (PGE₂) therapy for chronic viral hepatitis B and C. *J. Viral Hepat.* **6**: 329-336.
- IJIMA, H., NEURATH, M. F., NAGAISHI, T., GLICKMAN, J. N., NIEUWENHUIS, E. E., NAKAJIMA, A., CHEN, D., FUSS, I. J., UTKU, N., LEWICKI, D. N., BECKER, C., GALLAGHER, T. M., HOLMES, K. V., et BLUMBERG, R. S. 2004. Specific regulation of T helper cell 1-mediated murine colitis by CEACAM1. *J. Exp. Med.* **199**: 471-482.
- IKAWA, T., FUJIMOTO, S., KAWAMOTO, H., KATSURA, Y., et YOKOTA, Y. 2001. Commitment to natural killer cells requires the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 5164-5169.

- ILAN, Y. 1999. Oral tolerance: a new tool for the treatment of gastrointestinal inflammatory disorders and liver-directed gene therapy. *Can. J. Gastroenterol.* **13**: 829-835.
- ILANTZIS, C., DEMARTE, L., SCREATON, R. A., et STANNERS, C. P. 2002. Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. *Neoplasia.* **4**: 151-163.
- ISOGAWA, M., ROBEK, M. D., FURUICHI, Y., et CHISARI, F. V. 2005. Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J. Virol.* **79**: 7269-7272.
- ITOH, H., ABO, T., SUGAWARA, S., KANNO, A., et KUMAGAI, K. 1988. Age-related variation in the proportion and activity of murine liver natural killer cells and their cytotoxicity against regenerating hepatocytes. *J. Immunol.* **141**: 315-323.
- ITOH, Y., MORITA, A., NISHIOJI, K., FUJII, H., NAKAMURA, H., KIRISHIMA, T., TOYAMA, T., YAMAUCHI, N., NAGAO, Y., NARUMI, S., et OKANOUE, T. 2001. Time course profile and cell-type-specific production of monokine induced by interferon-gamma in Concanavalin A-induced hepatic injury in mice: comparative study with interferon-inducible protein-10. *Scand. J. Gastroenterol.* **36**: 1344-1351.
- IZZI, L., TURBIDE, C., HOUDE, C., KUNATH, T., et BEAUCHEMIN, N. 1999. cis-Determinants in the cytoplasmic domain of CEACAM1 responsible for its tumor inhibitory function. *Oncogene.* **18**: 5563-5572.
- JACQUES, A., BLEAU, C., MARTIN, J. P., et LAMONTAGNE, L. 2008. Intrahepatic endothelial and Kupffer cells involved in immunosuppressive and NK/NK-T cell disorders in the viral acute hepatitis. *Clin. Exp. Immunol.* **152**: 298-310.

- JIANG, Y., XU, J., ZHOU, C., WU, Z., ZHONG, S., LIU, J., LUO, W., CHEN, T., QIN, Q., et DENG, P. 2005. Characterization of cytokine/chemokine profiles of severe acute respiratory syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **171**: 850-857.
- JINUSHI, M., TAKEHARA, T., KANTO, T., TATSUMI, T., GROH, V., SPIES, T., MIYAGI, T., SUZUKI, T., SASAKI, Y., et HAYASHI, N. 2003. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J. Immunol.* **170**: 1249-1256.
- JOHNSTON, B., KIM, C. H., SOLER, D., EMOTO, M., et BUTCHER, E. C. 2003. Differential chemokine responses and homing patterns of murine TCR alpha beta NKT cell subsets. *J. Immunol.* **171**: 2960-2969.
- JOLICOEUR, P., et LAMONTAGNE, L. 1989. Mouse hepatitis virus 3 pathogenicity expressed by a lytic viral infection in bone marrow 14.8+ mu+ B lymphocyte subpopulations. *J. Immunol.* **143**: 3722-3730.
- JOLICOEUR, P., et LAMONTAGNE, L. 1994. Impaired T and B cells subpopulations involved in a chronic disease induced by mouse hepatitis virus type 3. *J. Immunol.* **153**: 1318-1327.
- JONULEIT, H., SCHMITT, E., KAKIRMAN, H., STASSEN, M., KNOP, J., et ENK, A. H. 2002. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J. Exp. Med.* **196**: 255-260.
- JONULEIT, H., SCHMITT, E., STASSEN, M., TUETTENBERG, A., KNOP, J., et ENK, A. H. 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* **193**: 1285-1294.
- JORDAN, M. S., BOESTEANU, A., REED, A. J., PETRONE, A. L., HOLENBECK, A. E., LERMAN, M. A., NAJI, A., et CATON A. J. 2001. Thymic selection of

- CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* **2**: 301-306.
- JUKES, J. P., WOOD, K. J., et JONES, N. D. 2007. Natural killer T cells: a bridge to tolerance or a pathway to rejection? *Transplantation.* **84**: 679-681.
 - KAGI, D., VIGNAUX, F., LEDERMANN, B., BURKI, K., DEPRAETERE, V., NAGATA, S., HENGARTNER, H., et GOLSTEIN, P. 1994. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science.* **265**: 528-530.
 - KAJITA, E., NISHIYA, T., et MIWA, S. 2006. The transmembrane domain directs TLR9 to intracellular compartments that contain TLR3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**: 578-584.
 - KAKIMI, K., GUIDOTTI, L. G., KOEZUKA, Y., et CHISARI, F. V. 2000. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J. Exp. Med.* **192**: 921-930.
 - KALINA, U., KAUSCHAT, D., KOYAMA, N., NUERNBERGER, H., BALLAS, K., KOSCHMIEDER, S., BUG, G., HOFMANN, W. K., HOELZER, D., et OTTMANN, O. G. 2000. IL-18 activates STAT3 in the natural killer cell line 92, augments cytotoxic activity, and mediates IFN-gamma production by the stress kinase p38 and by the extracellular regulated kinases p44erk-1 and p42erk-21. *J. Immunol.* **165**: 1307-1313.
 - KAMINSKA, B. 2005. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy - from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim. Biophys. Acta.* **175**: 253-262.
 - KAMMERER, R., HAHN, S., SINGER, B. B., LUO, J. S., et VON KLEIST, S. 1998. Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: structure, expression and involvement in T cell activation. *Eur. J. Immunol.* **28**: 3664-3374.

- KAMMERER, R., STOBER, D., SINGER, B. B., OBRINK, B., et REIMANN, J. 2001. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 on murine dendritic cells is a potent regulator of T cell stimulation. *J. Immunol.* **166**: 6537-6544.
- KANEKO, Y., HARADA, M., KAWANO, T., YAMASHITA, M., SHIBATA, Y., GEJYO, F., NAKAYAMA, T., et TANIGUCHI, M. 2000. Augmentation of Valpha14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *J. Exp. Med.* **191**: 105-114.
- KANTO, T., et HAYASHI, N. 2006. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. *Intern. Med.* **45**: 183-191.
- KAPIKIAN, A. Z. 1975. The coronaviruses. *Dev. Biol. Stand.* **28**: 42-64.
- KARRAR, A., BROOME, U., UZUNEL, M., QURESHI, A. R., et SUMITRAN-HOLGERSSON, S. 2007. Human liver sinusoidal endothelial cells induce apoptosis in activated T cells : a role in tolerance induction. *Gut.* **56**: 243-252.
- KAWAI, T., ADACHI, O., OGAWA, T., TAKEDA, K., et AKIRA, S. 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* **11**: 115-122.
- KAWAI, T., et AKIRA, S. 2005. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **17**: 338-344.
- KAWAMURA, T., TAKEDA, K., MENDIRATTA, S. K., KAWAMURA, H., VAN KAER, L., YAGITA, H., ABO, T., et OKUMURA, K. 1998. Critical role of NK1+ T cells in IL-12-induced immune responses in vivo. *J. Immunol.* **160**: 16-19.
- KELLY, J., BEDDALL, M. H., YU, D., IYER, S. R., MARSH, J. W., et WU, Y. 2008. Human macrophages support persistent transcription from unintegrated HIV-1 DNA. *Virology.* **372**: 300-312.

- KIKLY, K., et DENNERT, G. 1992. Evidence for extrathymic development of TNK cells. NK1+ CD3+ cells responsible for acute marrow graft rejection are present in thymus-deficient mice. *J. Immunol.* **149**: 403-412.
- KIMURA, K., KAKIMI, K., WIELAND, S., GUIDOTTI, L. G., et CHISARI, F. V. 2002a. Activated intrahepatic antigen-presenting cells inhibit hepatitis B virus replication in the liver of transgenic mice. *J. Immunol.* **169**: 5188-5195.
- KIMURA, K., KAKIMI, K., WIELAND, S., GUIDOTTI, L. G., et CHISARI, F. V. 2002b. Interleukin-18 inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J. Virol.* **76**: 10702-10707.
- KIMURA, M. Y., et NAKAYAMA, T. 2005. Differentiation of NK1 and NK2 cells. *Crit. Rev. Immunol.* **25**: 361-374.
- KIMURA, T., SAITO, T., YOSHIMURA, M., YIXUAN, S., BABA, M., JI, G., MURAMATSU, M., et KAWATA, S. 2006. Association of transforming growth factor-beta 1 functional polymorphisms with natural clearance of hepatitis C virus. *J. Infect. Dis.* **193**: 1371-1374.
- KIRSHNER, J., CHEN, C. J., LIU, P., HUANG, J., et SHIVELY, J. E. 2003. CEACAM1-4S, a cell-cell adhesion molecule, mediates apoptosis and reverts mammary carcinoma cells to a normal morphogenic phenotype in a 3D culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**: 521-526.
- KLUGEWITZ, K., ADAMS, D. H., EMOTO, M., EULENBURG, K., et HAMANN, A. 2004. The composition of intrahepatic lymphocytes: shaped by selective recruitment? *Trends Immunol.* **25**: 590-594.
- KNOLLE, P., SCHLAAK, J., UHRIG, A., KEMPF, P., MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H., et GERKEN, G. 1995. Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J. Hepatol.* **22**: 226-229.
- KNOLLE, P. A., et GERKEN, G. 2000. Local control of the immune response in the liver. *Immunol. Rev.* **174**: 21-31.

- KNOLLE, P. A., GERMANN, T., TREICHEL, U., UHRIG, A., SCHMITT, E., HEGENBARTH, S., LOHSE, A. W. et GERKEN, G. 1999b. Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells. *J. Immunol.* **162**: 1401-1407.
- KNOLLE, P. A., SCHMITT, E., JIN, S., GERMANN, T., DUCHMANN, R., HEGENBARTH, S., GERKEN, G., et LOHSE, A. W. 1999a. Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology.* **116**: 1428-1440.
- KNOLLE, P. A., UHRIG, A., HEGENBARTH, S., LOSER, E., SCHMITT, E., GERKEN, G., et LOHSE, A. W. 1998. 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.* **114**: 427-433.
- KOLIOS, G., VALATAS, V., et KOUROUMALIS, E. 2006. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J. Gastroenterol.* **12**: 7413-7420.
- KUESPERT, K., PILS, S., et HAUCK, C. R. 2006. CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **18**: 565-571.
- KUO, L., et MASTERS, P. S. 2003. The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication. *J. Virol.* **77**: 4597-4608.
- KUO, L., et MASTERS, P. S. 2002. Genetic evidence for a structural interaction between the carboxyl termini of the membrane and nucleocapsid proteins of mouse hepatitis virus. *J. Virol.* **76**: 4987-4999.
- KUROKI, M., MATSUO, Y., KINUGASA, T., et MATSUOKA, Y. 1992. Augmented expression and release of nonspecific cross-reacting antigens (NCAs), members of the CEA family, by human neutrophils during cell activation. *J. Leukoc. Biol.* **52**: 551-557.

- KURT-JONES, E. A., CHAN, M., ZHOU, S., WANG, J., REED, G., BRONSON, R., ARNOLD, M. M., KNIPE, D. M., et FINBERG, R. W. 2004. Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**: 1315-1320.
- KURT-JONES, E. A., POPOVA, L., KWINN, L., HAYNES, L. M., JONES, L. P., TRIPP, R. A., WALSH, E. E., FREEMAN, M. W., GOLENBOCK, D. T., ANDERSON, L. J., FINBERG, R. W. 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.* **1**: 398-401.
- KUSTERS, S., GANTNER, F., KUNSTLE, G., et TIEGS, G. 1996. Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by concanavalin A. *Gastroenterology.* **111**: 462-471.
- KUSTERS, S., TIEGS, G., ALEXOPOULOU, L., PASPARAKIS, M., DOUNI, E., KUNSTLE, G., BLUETHMANN, H., WENDEL, A., PFIZENMAIER, K., KOLLIAS, G., et GRELL, M. 1997. In vivo evidence for a functional role of both tumor necrosis factor (TNF) receptors and transmembrane TNF in experimental hepatitis. *Eur. J. Immunol.* **27**: 2870-2875.
- LAI, M. M. C., et CAVANAGH, D. 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **48**: 1-100.
- LAMIREAU, T., DESMOULIERE, A., BIOULAC-SAGE P., et ROSENBAUM, J. 2002. Mécanismes de la fibrogénèse hépatique Mechanisms of liver fibrogenesis. *Arch. Pediatr.* **9**: 392-405.
- LAMONTAGNE, L., DECARIE, D., et DUPUY, J. M. 1989a. Host resistance to mouse hepatitis virus type 3 is expressed in vitro in macrophages and lymphocytes. *Viral Immunol.* **2**: 37-45.
- LAMONTAGNE, L., DESCOTEAUX, J. P., et JOLICOEUR, P. 1989b. Mouse hepatitis virus 3 replication in T and B lymphocytes correlate with viral pathogenicity. *J. Immunol.* **142**: 4458-4465.

- LAMONTAGNE, L., et DUPUY, J. M. 1984. Persistent infection with mouse hepatitis virus 3 in mouse lymphoid cell lines. *Infect. Immunol.* **44**: 716-723.
- LAMONTAGNE, L., et DUPUY, J. M. 1985. Non H-2 related resistance genes to MHV3 infection are expressed in lymphoid cells and macrophages. Symposium in genetic control of host resistance to infection and malignancy. Montréal, Canada. pp. 141-150.
- LAMONTAGNE, L., et DUPUY, J. M. 1987. Characterization of a non-pathogenic MHV variant derived from a persistently infected cell line. *Adv. Exp. Med. Biol.* **218**: 255-263.
- LAMONTAGNE, L., et JOLICOEUR, P. 1991. Mouse hepatitis virus 3 thymic cell interactions correlating with viral pathogenicity. *J. Immunol.* **146**: 3152-3159.
- LAMONTAGNE, L., et JOLICOEUR, P. 1994. Low-virulent mouse hepatitis viruses exhibiting various tropisms in macrophages, T and B cell subpopulations, and thymic stromal cells. *Lab. Anim. Sci.* **44**: 17-24.
- LAMONTAGNE, L., LUSIGNAN, S., et PAGÉ, C. 2001. Recovery from mouse hepatitis virus infection depends on recruitment of CD8(+) cells rather than activation of intrahepatic CD4(+)alpha-beta(-)TCR(inter) or NK-T cells. *Clin. Immunol.* **101**: 345-356.
- LAMONTAGNE, L., MASSICOTTE, E., et PAGE, C. 1997. Mouse hepatitis viral infection induces and extrathymic differentiation of the specific intrahepatic alpha beta-TCRintermediate LFA-1high T-cell population. *Immunology.* **90**: 402-410.
- LAMONTAGNE, L., PAGE, C., BRAUNWALD, J., et MARTIN, J. P. 1994. Pathogenicity of neutralization escape mutants of mouse hepatitis virus: correlation with T- and B-cell depletions. *Res. Immunol.* **145**: 553-565.
- LANIER, L. L., CORLISS, B. C., WU, J., LEONG, C., et PHILLIPS, J. H. 1998. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature.* **391**: 703-707.

- LAU, A. H., et THOMSON, A. W. 2003. Dendritic cells and immune regulation in the liver. *Gut*. **52**: 307-314.
- LAU, Y. L., et PEIRIS, J. S. M. 2005. Pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Curr. Opin. Immun.* **17**: 404-410.
- LAUWERYS, B. R., RENAULD, J. C., et HOUSSIAU, F. A. 1999. Synergistic proliferation and activation of natural killer cells by interleukin 12 and interleukin 18. *Cytokine*. **11**: 822-830.
- LEE, N., HUI, D., WU, A., CHAN, P., CAMERON, P., JOYNT, G. M., AHUJA, A., YUNG, M. Y., LEUNG, C. B., TO, K. F., LUI, S. F., SZETO, C. C., CHUNG, S., et SUNG, J. J. 2003. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N. Engl. J. Med.* **348**: 1986-1994.
- LEE, R. K., SPIELMAN, J., ZHAO, D. Y., OLSEN, K. J., et PODACK, E. R. 1996. Perforin, Fas ligand, and tumor necrosis factor are the major cytotoxic molecules used by lymphokine-activated killer cells. *J. Immunol.* **157**: 1919-1925.
- LEHOUX, M., JACQUES, A., LUSIGNAN, S., et LAMONTAGNE, L. 2004. Murine viral hepatitis involves NK cell depletion associated with virus-induced apoptosis. *Clin. Exp. Immunol.* **137**: 41-51.
- LEIFELD, L., CHENG, S., RAMAKERS, J., DUMOULIN, F. L., TRAUTWEIN, C., SAUERBRUCH, T., et SPENGLER, U. 2002. Imbalanced intrahepatic expression of interleukin 12, interferon gamma, and interleukin 10 in fulminant hepatitis B. *Hepatology*. **36**: 1001-1008.
- LEIFELD, L., TRAUTWEIN, C., DUMOULIN, F. L., MANNS, M. P., SAUERBRUCH, T., et SPENGLER, U. 1999. Enhanced expression of CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), and CD40 and their ligands CD28 and CD154 in fulminant hepatic failure. *Am. J. Pathol.* **154**: 1711-1720.

- LE PREVOST, C., LEVY-LEBLOND, E., VIRELIZIER, J. L., et DUPUY, J. M. 1975. Immunopathology of mouse hepatitis virus type 3 infection. Role of humoral and cell-mediated immunity in resistance mechanisms. *J. Immunol.* **114**: 221-225.
- LERAY, D., DUPUY, C., et DUPUY, J. M. 1982. Immunopathology of mouse hepatitis virus type 3 infection. IV. MHV3-induced immunodepression. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **23**: 539-547.
- LEUNG, N., TURBIDE, C., OLSON, M., MARCUS, V., JOTHY, S., et BEAUCHEMIN, N. 2006. Deletion of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (Ceacam1) gene contributes to colon tumor progression in a murine model of carcinogenesis. *Oncogene.* **25**: 5527-5536.
- LEUSCH, H. G., DRZENIEK, Z., MARKOS-PUSZTAI, Z., et WAGENER, C. 1991. Binding of Escherichia coli and Salmonella strains to members of the carcinoembryonic antigen family: differential binding inhibition by aromatic α -glycosides of mannose. *Infect. Immun.* **59**: 2051-2057.
- LEVITSKY, H. I., GOLUMBEK, P. T., et PARDOLL, D. M. 1991. The fate of CD4-8- T cell receptor-alpha beta+ thymocytes. *J. Immunol.* **146**: 1113-1117.
- LEVY-LEBLOND, E., OTH, D., et DUPUY, J. M. 1979. Genetic study of mouse sensitivity to MHV3 infection: influence of the H-2 complex. *J. Immunol.* **122**: 1359-1362.
- LI, B., SUN, R., WEI, H., GAO, B., et TIAN, Z. 2006. Interleukin-15 prevents concanavalin A-induced liver injury in mice via NKT cell-dependent mechanism. *Hepatology.* **43**: 1211-1219.
- LI, Q., PARK, P. W., WILSON, C. L., et PARKS, W. C. 2002. Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. *Cell.* **111**: 635-646.
- LI, Y., ZHANG, T., HO, C., GRAVY, J. S., DOUGLAS, S. D., et HO, W. Z. 2004. Natural killer cells inhibit C virus expression. *J. Leukoc. Biol.* **76**: 1171-1179.

- LIMMER, A., OHL, J., KURTS, C., LJUNGGREN, H. G., REISS, Y., GROETTRUP, M., MOMBURG, F., ARNOLD, B., et KNOLLE, P. A. 2000. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8⁺ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat. Med.* **6**: 1348-1354.
- LIN, M. T., HINTON, D. R., PARRA, B., STOHLMAN, S. A., et VAN DER VEEN, R. C. 1998. The role of IL-10 in mouse hepatitis virus-induced demyelinating encephalomyelitis. *Virology.* **245**: 270-280.
- LIO, D., CARUSO, C., DI STEFANO, R., COLONNA ROMANO, G., FERRARO, D., SCOLA, L., CRIVELLO, A., LICATA, A., VALENZA, L. M., CANDORE, G., CRAXI, A., et ALMASIO, P. L. 2003. IL-10 and TNF-alpha polymorphisms and the recovery from HCV infection. *Hum. Immunol.* **64**: 674-680.
- LISSENBERG, A., VROLIJK, M. M., VAN VLIET A. L., LANGEREIS, M. A., DE GROOT-MIJNES, J. D., ROTTIER, P. J., et DE GROOT, R. J. 2005. Luxury at a cost? Recombinant Mouse hepatitis viruses expressing the accessory hemagglutinin-esterase protein display reduced fitness in vitro. *J. Virol.* **79**: 15054-15063.
- LIU, J., et THORP, S. C. 2002. Cell surface heparan sulfate and its roles in assisting viral infections. *Med. Res. Rev.* **22**: 1-25.
- LJUNGGREN, H. G., et KARRE, K. 1985. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J. Exp. Med.* **162**: 1745-1759.
- LOHR, H. F., WEBER, W., SCHLAAK, J., GOERGEN, B., MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H., et GERKEN, G. 1995. Proliferative response of CD4⁺ T cells and hepatitis B virus clearance in chronic hepatitis with or without hepatitis B e-minus hepatitis B virus mutants. *Hepatology.* **22**: 61-68.
- LOHSE, A. W., KNOLLE, P. A., BILO, K., UHRIG, A., WALDMANN, C., IBE, M., SCHMITT, E., GERKEN, G., et MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H. 1996.

Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology*. **110**: 1175-1181.

- LOK, A. S. 2000. Hepatitis B infection: pathogenesis and management. *J. Hepatol.* **32**: 89-97.
- LONDON, W. T., et EVANS, A. A. 1996. The epidemiology of hepatitis viruses B, C, and D. *Clin. Lab. Med.* **16**: 251-271.
- LONG, E. O., BURSHTYN, D. N., CLARK, W. P., PERUZZI, M., RAJAGOPALAN, S., ROJO, S., WAGTMANN, N., et WINTER, C. C. 1997. Killer cell inhibitory receptors: diversity, specificity, and function. *Immunol. Rev.* **155**: 135-144.
- LOUTFY, M. R., BLATT, L. M., SIMINOVITCH, K. A., WARD, S., WOLFF, B., LHO, H., PHAM, D. H., DEIF, H., LAMERE, E. A., CHANG, M., KAIN, K. C., FARCAS, G. A., FERGUSON, P., LATCHFORD, M., LEVY, G., DENNIS, J. W., LAI, E. K., et FISH, E. N. 2003. Interferon alfacon-1 plus corticosteroids in severe acute respiratory syndrome: a preliminary study. *JAMA*. **290**: 3222-3228.
- LOWIN, B., HAHNE, M., MATTMANN, C., et TSCHOPP, J. 1994. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature*. **370**: 650-652.
- LOZA, M. J., et PERUSSIA, B. 2001. Final steps of natural killer cell maturation: a model for type 1-type 2 differentiation? *Nat. Immunol.* **2**: 917-924.
- LOZA, M. J., PETERS, S. P., ZANGRILLI, J. G., et PERUSSIA, B. 2002. Distinction between IL-13⁺ and IFN-gamma⁺ natural killer cells and regulation of their pool size by IL-4. *Eur. J. Immunol.* **32**: 413-423.
- LUCCHIARI, M. A., MODOLELL, M., EICHMANN, K., et PEREIRA, C. A. 1992. In vivo depletion of interferon-gamma leads to susceptibility of A/J mice to mouse hepatitis virus 3 infection. *Immunobiology*. **185**: 475-482.

- LUCCHIARI, M. A., MODOLELL, M., VASSAO, R. C., et PEREIRA, C. A. 1993. TNF alpha, IL-1 and O2- release by macrophages do not correlate with the anti-mouse hepatitis virus 3 effect induced by interferon gamma. *Microb. Pathog.* **15**: 447-454.
- LUCKA, L., FERNANDO, M., GRUNOW, D., KANNICHT, C., HORST, A. K., NOLLAU, P., et WAGENER, C. 2005. Identification of Lewis x structures of the cell adhesion molecule CEACAM1 from human granulocytes. *Glycobiology.* **15**: 87-100.
- MACDONALD, H. R. Development and selection of NK-T cells. 2002. *Curr. Opin. Immunol.* **14**: 250-254.
- MADU, I. G., CHU, V. C., LEE, H., REGAN, A. D. BAUMAN, B. E. et WHITTAKER, G. R. 2007. Heparan sulphate is a selective attachment factor for the avian coronavirus infectious bronchitis virus Beaudette. *Avian Dis.* **51**: 45-51.
- MAJNO, G. 1979. The story of the myofibroblasts. *Am. J. Surg. Pathol.* **6**: 535-542.
- MAKI, G., KLINGEMANN, H. G., MARTINSON, J. A., et TAM Y. K. 2001. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J. Hematother. Stem Cell Res.* **10**: 369-383.
- MAKINO, Y., YAMAGATA, N., SASHO, T., ADACHI, Y., KANNO, R., KOSEKI, H., KANNO, M., et TANIGUCHI, M. 1993. Extrathymic development of V alpha 14-positive T cells. *J. Exp. Med.* **177**: 1399-1408.
- MALLEVAEY, T., FONTAINE, J., BREUILH, L., PAGET, C., CASTRO-KELLER, A., VENDEVILLE, C., CAPRON, M., LEITE-DE-MORAES, M., TROTTEIN, F., et FAVEEUW, C. 2007. Invariant and noninvariant natural killer T cells exert opposite regulatory functions on the immune response during murine schistosomiasis. *Infect. Immun.* **75**: 2171-2180.
- MARINHO, R., PINTO, R., SANTOS, M. L, et DE, M. 2002. Evidence for prostaglandin-producing supressor cells in HCV patients with normal ALT. *Dig. Dis. Sci.* **47**: 556-561.

- MARKEL, G., ACHDOUT, H., KATZ, G., LING, K. L., SALIO, M., GRUDA, R., GAZIT, R., MIZRAHI, S., HANNA, J., GONEN-GROSS, T., ARNON, T. I., LIEBERMAN, N., STREN, N., NACHMIAS, B., BLUMBERG, R. S., STEUER, G., BLAU, H., CERUNDOLO, V., MUSSAFFI, H., et MANDELBOIM, O. 2004b. Biological function of the soluble CEACAM1 protein and implications in TAP2-deficient patients. *Eur. J. Immunol.* **34**: 2138-2148.
- MARKEL, G., LIEBERMAN, N., KATZ, G., ARNON, T. I., LOTEM, M., DRIZE, O., BLUMBERG, R. S., BAR-HAIM, E., MADER, R., EISENBACH, L., et MANDELBOIM, O. 2002a. CD66a interactions between human melanoma and NK cells: a novel class I MHC-independent inhibitory mechanism of cytotoxicity. *J. Immunol.* **168**: 2803-2810.
- MARKEL, G., MUSSAFI, H., LING, K. L., SALIO, M., GADOLA, S., STEUER, G., BLAU, H., ACHDOUT, H., DE MIGUEL, M., GONEN-GROSS, T., HANNA, J., ARNON, T. I., QIMRON, U., VOLOVITZ, I., EISENBACH, L., BLUMBERG, R. S., PORGADOR, A., CERUNDOLO, V., et MANDELBOIM, O. 2004a. The mechanisms controlling NK cell autoreactivity in TAP2-deficient patients. *Blood.* **103**: 1770-1778.
- MARKEL, G., WOLF, D., HANNA, J., GAZIT, R., GOLDMAN-WOHL, D., LAVY, Y., YAGEL, S., et MANDELBOIM, O. 2002b. Pivotal role of CEACAM1 protein in the inhibition of activated decidual lymphocyte functions. *J. Clin. Invest.* **110**: 943-953.
- MARTIN, J. P., CHEN, W., KOEHREN, F., et PEREIRA, C. A. 1994. The virulence of mouse hepatitis virus 3, as evidenced by permissivity of cultured hepatic cells toward escaped mutants. *Res. Virol.* **145**: 297-302.
- MASOPUST, D., VEZYS, V., MARZO, A. L., et LEFRANÇOIS, L. 2001. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science.* **291**: 2413-2417.

- MAST, E. E., et KRAWCZYNSKI, K. 1996. Hepatitis E: an overview. *Annu. Rev. Med.* **47**: 257-266.
- MATANO, Y., MIURA, M., KOJIMA, N., SATO, M., IMAI, K., et SENOO, H. 1999. Hepatic stellate cells and extrahepatic stellate cells (extrahepatic vitamine A-storing cells). *Cells Hepatic Sinusoid.* **7**: 26-27.
- MATSUYAMA, S., UJIKE, M., MORIKAWA, S., TASHIRO, M., et TAGUCHI, F. 2005. Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **30**: 12543-12547.
- MAVROPOULOS, A., SULLY, G., COPE, A. P., et CLARK, A. R. 2005. Stabilization of IFN-gamma mRNA by MAPK p38 in IL-12- and IL-18-stimulated human NK cells. *Blood.* **105**: 282-288.
- MCCLARY, H., KOCH, R., CHISARI, F. V., et GUIDOTTI, L. G. 2000. Relative sensitivity of hepatitis B virus and other hepatotropic viruses to the antiviral effects of cytokines. *J. Virol.* **74**: 2255-2264.
- MCGILVRAY, I. D., LU, Z., WEI, A. C., A. P. DACKIW, A. P., MARSHALL, J. C., KAPUS, A., LEVY, G., et ROTSTEIN O. D. 1998. Murine hepatitis virus strain 3 induces the macrophage prothrombinase fgl-2 through p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* **273**: 32222-32229.
- MCINTOSH, K. 1974. Coronaviruses: a comparative review. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **63**: 85-129.
- MCINTOSH, K., BECKER, W. B., et CHANOCK, R. M. 1967. Growth in suckling-mouse brain of "IBV-like" viruses from patients with upper respiratory tract disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **58**: 2268-2273.
- MCINTYRE, K. W., et WELSH, R. M. 1986. Accumulation of natural killer and cytotoxic T large granular lymphocytes in the liver during virus infection. *J. Exp. Med.* **164**: 1667-1681.

- MEDZHITOV, R., et JANEWAY Jr, C. A. 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. **296**: 298-300.
- MELLO, I. G., VASSAO, R. C., et PEREIRA, C. A. 1993. Virus specificity of the antiviral state induced by IFN gamma correlates with the resistance to MHV3 infection. *Arch. Virol.* **132**: 281-289.
- MIDDLETON, J., NEIL, S., WINTLE, J., CLARK-LEWIS, I., MOORE, H., LAM, C., AUER, M., HUB, E., et ROT, A. 1997. Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell*. **91**: 385-395.
- MIDDLETON, J., PATTERSON, A. M., GARDNER, L., SCHMUTZ, C., et ASHTON, B. A. 2002. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood*. **100**: 3853-3860.
- MILICH, D. R., SCHODEL, F., HUGHES, J. L., JONES, J. E., et PETERSON, D. L. 1997. The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype. *J. Virol.* **71**: 2192-2201.
- MILLER, R. L., MENG, T. C., et TOMAI, M. A. 2008. The antiviral activity of Toll-like receptor 7 and 7/8 agonists. *Drug News Perspect.* **21**: 69-87.
- MIURA, T. A., TRAVANTY, E. A., OKO, L., BIELEFELDT-OHMANN, H., WEISS, S. R., BEAUCHEMIN, N., et HOLMES, K. V. 2008. The spike glycoprotein of murine coronavirus MHV-JHM mediates receptor-independent infection and spread in the central nervous systems of Ceacam1a^{-/-} Mice. *J. Virol.* **82**: 755-763.
- MIYASO, H., MORIMOTO, Y., OZAKI, M., HAGA, S., SHINOURA, S., CHODA, Y., MURATA, H., KATSUNO, G., HUDA, K., TAKAHASHI, H., TANAKA, N., et IWAGAKI, H. 2006. Protective effects of nafamostat mesilate on liver injury induced by lipopolysaccharide in rats: possible involvement of CD14 and TLR-4 downregulation on Kupffer cells. *Dig. Dis. Sci.* **51**: 2007-2012.

- MIZUTANI, T., FUKUSHI, S., MURAKAMI, M., HIRANO, T., SAIJO, M., KURANE, I., et MORIKAWA, S. 2004a. Tyrosine dephosphorylation of STAT3 in SARS coronavirus-infected Vero E6 cells. *FEBS Lett.* **577**: 187-192.
- MIZUTANI, T., FUKUSHI, S., SAIJO, M., KURANE, I., et MORIKAWA, S. 2004b. Importance of Akt signaling pathway for apoptosis in SARS-CoV-infected Vero E6 cells. *Virology.* **327**: 169-174.
- MIZUTANI, T., FUKUSHI, S., SAIJO, M., KURANE, I., et MORIKAWA, S. 2005. JNK and PI3K/Akt signaling pathways are required for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1741**: 4-10.
- MIZUTANI, T., FUKUSHI, S., SAIJO, M., KURANE, I., et MORIKAWA, S. 2004c. Phosphorylation of p38 MAPK and its downstream targets in SARS coronavirus-infected cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**: 1228-1234.
- MOHANDAS, D., et DALES, S. 1991. Endosomal association of a protein phosphatase with high dephosphorylating activity against a coronavirus nucleocapsid protein. *FEBS Lett.* **282**: 419-424.
- MOLLER, M. J., KAMMERER, R., GRUNERT, F., et VON KLEIST, S. 1996. Biliary glycoprotein (BGP) expression on T cells and on a natural-killer-cell subpopulation. *Int. J. Cancer.* **65**: 740-745.
- MONSALVE-DE CASTILLO, F., ROMERO, T. A., ESTEVEZ, J., COSTA, L. L., ATENCIO, R., PORTO, L., et CALLEJAS, D. 2002. Concentrations of cytokines, soluble interleukin-2 receptor, and soluble CD30 in sera of patients with hepatitis B virus infection during acute and convalescent phases. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**: 1372-1375.
- MOORE, T. A., BENNETT, M., et KUMAR, V. 1996. Murine natural killer cell differentiation: past, present and future. *Immunol. Res.* **15**: 151-162.

- MOREIRA, C., TSUHAKO, M. H., DE FRANCO, M. T., MODOLELL, M., et PEREIRA, C. A. 2004. Arginine metabolism during macrophage autocrine activation and infection with mouse hepatitis virus 3. *Immunobiology*. **209**: 585-598.
- MORETTA, L., et MORETTA, A. 2004. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J.* **23**: 255-259.
- MOSMANN, T. R., et SAD, S. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today*. **17**: 138-146.
- MUENZNER, P., BILLKER, O., MEYER, T. F., et NAUMANN, M. 2002. Nuclear factor-kappa B directs carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 receptor expression in *Neisseria gonorrhoeae*-infected epithelial cells. *Biol. Chem.* **277**: 7438-7446.
- MUENZNER, P., NAUMANN, M., MEYER, T. F., et GRAY-OWEN, S. D. 2001. Pathogenic *Neisseria* trigger expression of their carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 (CEACAM1; previously CD66a) receptor on primary endothelial cells by activating the immediate early response transcription factor, nuclear factor-kappaB. *J. Biol. Chem.* **276**: 24331-24340.
- MUENZNER, P., ROHDE, M., KNEITZ, S., et HAUCK, C. R. 2005. CEACAM engagement by human pathogens enhances cell adhesion and counteracts bacteria-induced detachment of epithelial cells. *J. Cell Biol.* **170**: 825-836.
- MUKHOPADHYAY, S., HERRE, J., BROWN, G. D., et GORDON, S. 2004. The potential for Toll-like receptors to collaborate with other innate immune receptors. *Immunology*. **112**: 521-530.
- NAGAISHI, T., IJIMA, H., NAKAJIMA, A., CHEN, D., et BLUMBERG, R. 2006. Role of CEACAM1 as a regulator of T cells. *Ann. NY Acad. Sci.* **1072**: 155-175.
- NAGATA, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell*. **88**: 355-365.

- NAJJAR, S. M. 2002. Regulation of insulin action by CEACAM1. *Trends Endocrinol. Metab.* **13**: 240-245.
- NAKAGAKI, K., NAKAGAKI, K., et TAGUCHI, F. 2005. Receptor-independent spread of a highly neurotropic murine coronavirus JHMV strain from initially infected microglial cells in mixed neural cultures. *J. Virol.* **79**: 6102-6110.
- NARAYANAN, K., CHEN, C. J., MAEDA, J., et MAKINO, S. 2003. Nucleocapsid-independent specific viral RNA packaging via viral envelope protein and viral RNA signal. *J. Virol.* **77**: 2922-2927.
- NASH, T. C., et BUCHMEIER, M. J. 1996. Spike glycoprotein-mediated fusion in biliary glycoprotein-independent cell-associated spread of mouse hepatitis virus infection. *Virology.* **233**: 68-78.
- NATUK, R. J., et WELSH, R. M. 1987. Accumulation and chemotaxis of natural killer/large granular lymphocytes at sites of virus replication. *J. Immunol.* **138**: 877-883.
- NATURE (Lond.). 1968. Coronaviruses. **220**: 650.
- NEDELLEC, P., DVEKSLER, G. S., DANIELS, E., TURBIDE, C., CHOW, B., BASILE, A. A., HOLMES, K. V., et BEAUCHEMIN, N. 1994. Bgp2, a new member of the carcinoembryonic antigen-related gene family, encodes an alternative receptor for mouse hepatitis viruses. *J. Virol.* **68**: 4525-4537.
- NELSON, D. R., TU, Z., SOLDEVILA-PICO, C., ABDELMALEK, M., ZHU, H., XU, Y. L., CABRERA, R., LIU, C., et DAVIS, G. L. 2003. Long-term interleukin 10 therapy in chronic hepatitis C patients has a proviral and anti-inflammatory effect. *Hepatology.* **38**: 859-868.
- NEUMAN, M. G., BENHAMOU, J. P., BOURLIERE, M., IBRAHIM, A., MALKIEWICZ, I., ASSELAH, T., MARTINOT-PEIGNOUX, M., SHEAR, N. H., KATZ, G. G., AKREMI, R., BENALI, S., BOYER, N., LECOMTE, L., LE BRETON, V., LE GULUDEC, G., et MARCELLIN, P. 2002. Serum tumour necrosis

factor-alpha and transforming growth factor-beta levels in chronic hepatitis C patients are immunomodulated by therapy. *Cytokine*. **17**: 108-117.

- NGUYEN, K. B., SALAZAR-MATHER, T. P., DALOD, M. Y., VAN DEUSEN, J. B., WEI, X. Q., LIEW, F. Y., CALIGIURI, M. A., DURBIN, J. E., et BIRON, C. A. 2002. Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J. Immunol.* **169**: 4279-4287.
- NITTKA, S., GUNTHER, J., EBISCH, C., ERBERSDOBLER, A., et NEUMAIER, M. 2004. The human tumor suppressor CEACAM1 modulates apoptosis and is implicated in early colorectal tumorigenesis. *Oncogene*. **23**: 9306-9313.
- NOMURA, F., AKASHI, S., SAKAO, Y., SATO, S., KAWAI, T., MATSUMOTO, M., NAKANISHI, K., KIMOTO, M., MIYAKE, K., TAKEDA, K., et AKIRA, S., 2000. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J. Immunol.* **16**: 3476-3479.
- NORRIS, S., COLLINS, C., DOHERTY, D. G., SMITH, F., MCENTEE, G., TRAYNOR, O., NOLAN, N., HEGARTY, J., et O'FARRELLY, C. 1998. Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *J. Hepatol.* **28**: 84-90.
- NUNEZ, A., GOMEZ-VILLAMANDOS, J. C., SANCHEZ-CORDON, P. J., FERNANDEZ DE MARCO, M., PEDRERA, M., SALGUERO, F. J., et CARRASCO, L. 2005. Expression of proinflammatory cytokines by hepatic macrophages in acute classical swine fever. *J. Comp. Pathol.* **133**: 23-32.
- OCHI, M., OHDAN, H., MITSUTA, H., ONOE, T., TOKITA, D., HARA, H., ISHIYAMA, K., ZHOU, W., TANAKA, Y., et ASAHARA, T. 2004. Liver NK cells expressing TRAIL are toxic against self hepatocytes in mice. *Hepatology*. **39**: 1321-1331.

- OGASAWARA, K., HIDA, S., AZIMI, N., TAGAYA, Y., SATO, T., YOKOCHI-FUKUDA, T., WALDMANN, T. A., TANIGUCHI, T., et TAKI, S. 1998. Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells. *Nature*. **391**: 700-703
- OHTEKI, T., et MACDONALD, H. R. 1994. Major histocompatibility complex class I related molecules control the development of CD4+8- and CD4-8- subsets of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells in the liver of mice. *J. Exp. Med.* **180**: 699-704.
- OHTEKI, T., OKUYAMA, R., SEKI, S., ABO, T., SUGIURA, K., KUSUMI, A., OHMORI, T., WATANABE, H., et KUMAGAI, K. 1992. Age-dependent increase of extrathymic T cells in the liver and their appearance in the periphery of older mice. *J. Immunol.* **149**: 1562-1570.
- OHTSUKA, N., et TAGUCHI, F. 1997. Mouse susceptibility to mouse hepatitis virus infection is linked to viral receptor genotype. *J. Virol.* **71**: 8860-8863.
- OKABAYASHI, T., KARIWA, H., YOKOTA, S., IKI, S., INDOH, T., YOKOSAWA, N., TAKASHIMA, I., TSUTSUMI, H., et FUJII, N. 2006. Cytokine regulation in SARS coronavirus infection compared to other respiratory virus infections. *J. Med. Virol.* **78**: 417-424.
- OLGA, O. Z., et NIKOLAI, D. Y. 2003. Invasive and non-invasive monitoring of hepatitis C virus-induced liver fibrosis: alternatives or complements? *Curr. Pharm. Biotechnol.* **4**: 195-209.
- OPSTELTEN, D. J. E., RAAMSMAN, M. J. B., WOLFS, K., HORZINEK, M. C., et ROTTIER, P. J. M. 1995. Enveloppe glycoprotein interactions in coronavirus assembly. *J. Cell. Biol.* **131**: 339-349.
- ORANGE, J. S., FASSETT, M. S., KOOPMAN, L. A., BOYSON, J. E., et STROMINGER, J. L. 2002. Viral evasion of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **3**: 1006-1012.

- ORTALDO, J. R., WINKLER-PICKETT, R., WIGGINTON, J., HORNER, M., BERE, E. W., MASON, A. T., BHAT, N., CHERRY, J., SANFORD, M., HODGE, D. L., et YOUNG, H. A. 2006. Regulation of ITAM-positive receptors: role of IL-12 and IL-18. *Blood*. **107**: 1468-1475.
- ORTALDO, J. R., et YOUNG, H. A. 2003. Expression of IFN-gamma upon triggering of activating Ly49D NK receptors in vitro and in vivo: costimulation with IL-12 or IL-18 overrides inhibitory receptors. *J. Immunol.* **170**: 1763-1769.
- OYANAGI, Y., TAKAHASHI, T., MATSUI, S., TAKAHASHI, S., BOKU, S., TAKAHASHI, K., FURUKAWA, K., ARAI, F., et ASAKURA, H. 1999. Enhanced expression of interleukin-6 in chronic hepatitis C. *Liver*. **19**: 464-472.
- PALADINO, N., FLOLRES, A. C., MARCOS, C. Y., FAINBOIM, H., THEILER, G., ARRUVITO, L., WILLIAMS, F., MIDDLETON, D., et FAINBOIM, L. 2007. Increased frequencies of activating natural killer receptors are associated with liver injury in individuals who do not eliminate hepatitis C virus. *Tissue Antigens*. **69**: 109-111.
- PALUDAN, S. R., MELCHJORSEN, J., MALMGAARD, L., et MOGENSEN, S. C. 2002. Expression of genes for cytokines and cytokine-related functions in leukocytes infected with Herpes simplex virus: comparison between resistant and susceptible mouse strains. *Eur. Cytokine Netw.* **13**: 306-316.
- PAPADAKIS, K. A., PREHN, J. L., LANDERS, C., HAN, Q., LUO, X., CHA, S. C., WEI, P., et TARGAN, S. R. 2004. TL1A synergizes with IL-12 and IL-18 to enhance IFN-gamma production in human T cells and NK cells. *J. Immunol.* **172**: 7002-7007.
- PARISH, C. R. 2006. The role of heparan sulphate in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **6**: 633-643.
- PARR, R. L., FUNG, L., RENEKER, J., MYERS-MASON, N., LEIBOWITZ, J. L., et LEVY, G. 1995. Association of mouse fibrinogen-like protein with murine hepatitis virus-induced prothrombinase activity. *J. Virol.* **69**: 5033-5038.

- PATHAK, M. K., et YI, T. 2001. Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. *J. Immunol.* **167**: 3391-3397.
- PAYNE, C. M., RAY, C. G., BORDUIN, V., MINNICH, L. L., et LEBOWITZ, M. D. 1986. An eight-year study of the viral agents of acute gastroenteritis in humans: ultrastructural observations and seasonal distribution with a major emphasis on coronavirus-like particles. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **5**: 39-54.
- PEIRIS, J. S., CHU, C. M., CHENG, V. C., CHAN, K. S., HUNG, I. F., POON, L. L., LAW, K. I., TANG, B. S., HON, T. Y., CHAN, C. S., CHAN, K. H., NG, J. S., ZHENG, B. J., NG, W. L., LAI, R. W., GUAN, Y., et YUEN, K. Y. 2003. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet.* **361**: 1767-1772.
- PENG, G., LI, S., WU, W., SUN, Z., CHEN, Y., et CHEN, Z. 2008. Circulating CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells correlate with chronic hepatitis B infection. *Immunology.* **123**: 57-65.
- PERLMAN, S., et DANDEKAR, A. A. 2005. Immunopathogenesis of coronavirus infections: implication for SARS. *Nat. Rev. Immunol.* **5**: 917-927.
- PERUSSIA, B., et LOZA, M. J. 2003. Linear "2-0-1" lymphocyte development: hypotheses on cellular bases for immunity. *Trends Immunol.* **24**: 235-241.
- PIEN, G. C., et BIRON, C. A. 2000. Compartmental differences in NK cell responsiveness to IL-12 during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J. Immunol.* **164**: 994-1001.
- PIEN, G. C., SATOSKAR, A. R., TAKEDA, K., AKIRA, S., et BIRON, C. A. 2000. Cutting edge: selective IL-18 requirements for induction of compartmental IFN-gamma responses during viral infection. *J. Immunol.* **165**: 4787-4791.
- PISEGNA, S., PIROZZI, G., PICCOLI, M., FRATI, L., SANTONI, A., et PALMIERI, G. 2004. p38 MAPK activation controls the TLR3-mediated up-

- regulation of cytotoxicity and cytokine production in human NK cells. *Blood*. **104**: 4157-4164.
- POIESI, C., DE FRANCESCO, M. A., BARONIO, M., et MANCA, N. 2007. HIV-1 p17 binds heparan sulfate proteoglycans to activated CD4(+) T cells. *Virus Res*. **132**: 25-32.
 - POLISH, L. B., GALLAGHER, M., FIELDS, H. A., et HADLER, S. C. 1993. Delta hepatitis: molecular biology and clinical and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**: 211-229.
 - POPOVA, R., et ZHANG, X. 2002. The spike but not the hemagglutinin/esterase protein of bovine coronavirus is necessary and sufficient for viral infection. *Virology*. **294**: 222-236.
 - POWRIE, F. 1995. T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles. *Immunity*. **3**: 171-174.
 - PUZANOV, I. J., WILLIAMS, N. S., SCHATZEL, J., SIVAKUMAR, P. V., BENNETT, M., et KUMAR, V. 1997. Ontogeny of NK1.1+ cells and the bone marrow microenvironment : where does IL-15 fit in? *Res. Immunol*. **148**: 195-201.
 - RACANELLI, V., et REHERMANN, B. 2006. The liver as an immunological organ. *Hepatology*. **43**: 54-62.
 - RALAINIRINA, N., POLI, A., MICHEL, T., POOS, L., ANDRES, E., HENTGES, F., et ZIMMER, J. 2007. Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory cells. *Immunology*. **120**: 73-82.
 - RANGER-ROGEZ, S., ALAIN, S., et DENIS, F. 2002. Hepatitis viruses: mother to child transmission. *Pathol. Biol*. **50**: 568-575.
 - RIORDAN, S. M., SKINNER, N. A., KURTOVIC, J., LOCARNINI, S., MCIVER, C. J., WILLIAMS, R., et VISVANATHAN, K. 2006. Toll-like receptor expression in

chronic hepatitis C: correlation with pro-inflammatory cytokine levels and liver injury. *Inflamm. Res.* **55**: 279-285.

- RIVERA, C. A., ADEGBOYEGA, P., VAN ROOIJEN, N., TAGALICUD, A., ALLMAN, M., et WALLACE, M. 2007. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* **47**: 571-579.
- RIZZETTO, M. 1983. The delta agent. *Hepatology.* **3**: 729-737.
- ROGOFF, T. M., et LIPSKY, P. E. 1980. Antigen presentation by isolated guinea pig Kupffer cells. *J. Immunol.* **124**: 1740-1744.
- ROLAND, C. R., MANGINO, M. J., DUFFY, B. F., et FLYE, M. W. 1993. Lymphocyte suppression by Kupffer cells prevents portal venous tolerance induction: a study of macrophage function after intravenous gadolinium. *Transplantation.* **55**: 1151-1158.
- ROLAND, C. R., WALP, L., STACK, R. M., et FLYE, M. W. 1994. Outcome of Kupffer cell antigen presentation to a cloned murine Th1 lymphocyte depends on the inducibility of nitric oxide synthase by IFN-gamma. *J. Immunol.* **153**: 5453-5464.
- ROLAND, J., SOULARD, V., SELLIER, C., DRAPIER, A. M., DI SANTO, J. P., CAZENAVE, P. A., et PIED, S. 2006. NK cell responses to Plasmodium infection and control of intrahepatic parasite development. *J. Immunol.* **177**: 1229-1239.
- ROSMARAKI, E. E., DOUAGI, I., ROTH, C., COLUCCI, F., CUMANO, A., et DI SANTO, J. P. 2001. Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. *Eur. J. Immunol.* **31**: 1900-1909.
- ROUVIER, E., LUCIANI, M. F., et GOLSTEIN, P. 1993. Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* **177**: 195-200.

- RUGGIERO, G., ANDREANA, A., NINNI, A., CURCI, G., UTILI, R., et GIUSTI, G. 1977. Clearance of viable Calmette-Guèrin bacillus by the in vitro isolated and perfused rat liver. *Acta Hepatogastroenterol. (Stuttg)*. **24**: 102-105.
- SADIR, R., IMBERTY, A., BALEUX, F., et LORTAT-JACOB, H. 2004. Heparan sulfate/heparin oligosaccharides protect stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against proteolysis induced by CD26/dipeptidyl peptidase IV. *J. Biol. Chem.* **279**: 43854-43860.
- SAITO, K., AIT-GOUGHOLTE, M., TRUSCOTT, S. M., MEYER, K., BLAZEVIC, A., ABATE, G., RAY, R. B., HOFT, D. F., et RAY, R. 2008. Hepatitis C virus inhibits cell surface expression of HLA-DR, prevents dendritic cell maturation and induces IL-10 production. *J. Virol.* **82**: 3320-3328.
- SAITO, S., NISHIKAWA, K., MORII, T., ENOMOTO, M., NARITA, N., MOTOYOSHI, K., et ICHIJO, M. 1993. Cytokine production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. *Int. Immunol.* **5**: 559-563.
- SAKAGUCHI, S., SAKAGUCHI, N., SHIMIZU, J., YAMAZAKI, S., SAKIHAMA, T., ITOH, M., KUNIYASU, Y., NOMURA, T., TODA, M., et TAKAHASHI, T. 2001. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* **182**: 18-32.
- SALAZAR-MATHER, T. P., HAMILTON, T. A., et BIRON, C. A. 2000. A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense. *J. Clin. Invest.* **105**: 985-993.
- SALAZAR-MATHER, T. P., ORANGE, J. S., et BIRON, C. A. 1998. Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha)-dependent pathways. *J. Exp. Med.* **187**: 1-14.

- SATO, A., LINEHAN, M. M., et IWASAKI, A. 2006. Dual recognition of herpes simplex viruses by TLR2 and TLR9 in dendritic cells. *PNAS*. **103**: 17343-17348.
- SATO, H., NAKAYAMA, T., TANAKA, Y., YAMASHITA, M., SHIBATA, Y., KONDO, E., SAITO, Y., et TANIGUCHI, M. 1999. Induction of differentiation of pre-NKT cells to mature Valpha14 NKT cells by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**: 7439-7444.
- SCHALK, A. F., et HAWN, M. C. 1931. An apparently new respiratory disease in baby chicks. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* **78**: 413-422.
- SCHEFFRAHN, I., SINGER, B. B., SIGMUNDSSON, K., LUCKA, L., et OBRINK, B. 2005. Control of density-dependent, cell state-specific signal transduction by the cell adhesion molecule CEACAM1, and its influence on cell cycle regulation. *Exp. Cell. Res.* **307**: 427-435.
- SCHIMPL, A., HUNIG, T. M., ELBE, A., BERBERICH, I., KRAMER, S., MERZ, H., FELLER, A. C., SADLACK, B., SCHORLE, H., et HORAK, I. 1994. Development and function of the immune system in mice with targeted disruption of the interleukin 2 gene. Academic Press, San Diego.
- SCHINDLER, L., ENGLER, H., et KIRCHNER, H. 1982. Activation of natural killer cells and induction of interferon after injection of mouse hepatitis virus type 3 in mice. *Infect. Immun.* **35**: 869-873.
- SCHMIDT, K. N., LEUNG, B., KWONG, M., ZAREMBER, K. A., SATYAL, S., NAVAS, T. A., WANG, F., et GODOWSKI, P. J. 2004. APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA. *J. Immunol.* **172**: 138-143.
- SCHRODER, M., MEISEL, C., BUHL, K., PROFANTER, N., SIEVERT, N., VOLK, H. D., et GRUTZ, G. 2003. Different modes of IL-10 and TGF- β to inhibit cytokine-dependant IFN- γ production : consequences for reversal of lipopolysaccharide desensitization. *J. Immunol.* **170**: 5260-5267.

- SCHUMANN, D., CHEN, C. J., KAPLAN, B., et SHIVELY, J. E. 2001. Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1 directly associates with cytoskeleton proteins actin and tropomyosin. *J. Biol. Chem.* **276**: 47421-47433.
- SEKI, S., HABU, Y., KAWAMURA, T., TAKEDA, K., DOBASHI, H., OHKAWA, T., et HIRAIDE, H. 2000. The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+T cells in T helper 1 immune responses. *Immunol. Rev.* **174**: 35-36.
- SEKI, S., OSADA, S., ONO, S., AOSASA, S., HABU, Y., NISHIKAGE, T., MOCHIZUKI, H., et HIRAIDE, H. 1998. Role of liver NK cells and peritoneal macrophages in gamma interferon and interleukin-10 production in experimental bacterial peritonitis in mice. *Infect. Immun.* **66**: 5286-5294.
- SENOO, H. 2004. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med. Electron. Microsc.* **37**: 3-15.
- SHARARA, A. I., HUNT, C. M., et HAMILTON, J. D. 1996. Hepatitis C. *Ann. Intern. Med.* **125**: 658-668.
- SHI, J., FUJIEDA, H., KOKUBO, Y., et WAKE, K. 1996. Apoptosis of neutrophils and their elimination by Kupffer cells in rat liver. *Hepatology.* **24**: 1256-1263.
- SHIBAHARA, S., KITAMURO, T., et TAKAHASHI, K. 2002. Heme degradation and human disease: diversity is the soul of life. *Antioxid. Redox Signal.* **4**: 593-602.
- SHIELDS, P. L., MORLAND, C. M., SALMON, M., QIN, S., HUBSCHER, S. G., et ADAMS, D. H. 1999. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J. Immunol.* **163**: 6236-6243.
- SHIMODA, K., BEGUM, N. A., SHIBUTA, K., MORI, M., BONKOVSKY, H. L., BANNER, B. F., et BARNARD, G. F. 1998. Interleukin-8 and hIRH (SDF1-alpha/PBSF) mRNA expression and histological activity index in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* **28**: 108-115.

- SIENEL, W., DANGO, S., WOELFLE, U., MORRESI-HAUF, A., WAGENER, C., BRUMMER, J., MUTSCHLER, W., PASSLICK, B., et PANTEL, K. 2003. Elevated expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 promotes progression of non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **9**: 2260-2266.
- SIMON, A. K., JONES, E., RICHARDS, H., WRIGHT, K., BETTS, G., GODKIN, A., SCREATON, G., et GALLIMORE, A. 2007. Regulatory cells inhibit Fas ligand-induced innate and adaptive tumor immunity. *Eur. J. Immunol.* **37**: 758-767.
- SIMS, A. C., OSTERMANN, J., et DENISON, M. R. 2000. Mouse hepatitis virus replicase proteins associate with two distinct populations of intracellular membranes. *J. Virol.* **74**: 5647-5654.
- SINGER, B. B., KLAILE, E., SCHEFFRAHN, I., MUELLER, M. M., KAMMERER, R., REUTTER, W., OBRINK, B., et LUCKA, L. 2005. CEACAM1 (CD66a) mediates delay of spontaneous and Fas ligand-induced apoptosis in granulocytes. *Eur. J. Immunol.* **35**: 1949-1959.
- SINGER, B. B., SCHEFFRAHN, I., HEYMANN, R., SIGMUNDSSON, K., KAMMERER, R., et OBRINK, B. 2002. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression and signaling in human, mouse, and rat leukocytes: evidence for replacement of the short cytoplasmic domain isoform by glycosylphosphatidylinositol-linked proteins in human leukocytes. *J. Immunol.* **168**: 5139-5146.
- SISSONS, J. P. G., et BORYSIEWICZ, L. K. 1985. Viral immunopathology. *Br. Med. Bull.* **41**: 34-40.
- SMITH, H. A., JONES, C. J., et HUNT, R. D. 1972. *Veterinary Pathology*. Fourth Edition. Lea & Febiger. Philadelphie (USA). 1521 pages.
- SONI, P., AL-HOSAINI, K. A., FERNSTROM, M. A., et NAJJAR, S. M. 1999. Cell adhesion properties and effects on receptor-mediated insulin endocytosis are

independent properties of pp120, a substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* **1**: 102-108.

- SPITS, H., et LANIER, L. L. 2007. Natural killer or dendritic: what's in a name? *Immunity.* **26**: 11-16.
- SPRENGERS, D., VANDER MOLEN, R. G., KUSTERS, J. G., HANSEN, B., NIESTER, H. G., SCHALM, S. W., et JANSSEN, H. L. 2006. Different composition of intrahepatic lymphocytes in the immune-tolerance and immune-clearance phase of chronic hepatitis. *Brit. J. Med. Virol.* **78**: 561-568.
- STEFFEN, A. M., PEREIRA, C. A., BINGEN, A., VALLE, M., MARTIN, J. P., KOEHREN, F., ROYER, C., GENDRAULT, J. L., et KIRN, A. 1995. Mouse hepatitis virus type 3 infection provokes a decrease in the number of sinusoidal endothelial cell fenestrae both in vivo and in vitro. *Hepatology.* **22**: 395-401.
- STERN, N., MARKEL, G., ARNON, T. I., GRUDA, R., WONG, H., GRAY-OWEN, S. D., et MANDELBOIM, O. 2005. Carcinoembryonic antigen (CEA) inhibits NK killing via interaction with CEA-related cell adhesion molecule 1. *J. Immunol.* **174**: 6692-6701.
- STOCKMAN, L. J., BELLAMY, R., et GARNER, P. 2006. SARS: systematic review of treatment effects. *PLoS Med.* **3**: e343.
- STOCKS, S. C., et KERR, M. A. 1993. Neutrophil NCA-160 (CD66) is the major protein carrier of selectin binding carbohydrate groups LewisX and sialyl lewisX. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**: 478-483.
- STOHLMAN, S. A., BERGMANN, C. C., et PERLMAN, S. 1998. Mouse hepatitis virus. In: AHMED, R., et CHEN, I. Eds. *Persistent viral infections*. John Wiley & Sons, New York. pp. 537-557.
- STOHLMAN, S. A., BRAYTON, P. R., HARMON, R. C., STEVENSON, D., GANGES, R. G., et MATSUSHIMA, G. K. 1983. Natural killer cell activity during

- mouse hepatitis virus infection: response in the absence of interferon. *Int. J. Cancer*. **31**: 309-314.
- STOHLMAN, S. A., et LAI, M. M. 1979. Phosphoproteins of murine hepatitis viruses. *J. Virol.* **32**: 672-675.
 - STRENGELL, M., MATIKAINEN, S., SIREN, J., LEHTONEN, A., FOSTER, D., JULKUNEN, I., et SARENEVA, T. 2003. IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-gamma production in human NK and T cells. *J. Immunol.* **170**: 5464-5469.
 - STRENGELL, M., SARENEVA, T., FOSTER, D., JULKUNEN, I., et MATIKAINEN, S. 2002. IL-21 up-regulates the expression of genes associated with innate immunity and Th1 response. *J. Immunol.* **169**: 3600-3605.
 - STRONGE, V. S., SALIO, M., JONES, E. Y., et CERUNDOLO, V. 2007. A closer look at CD1d molecules: new horizons in studying NKT cells. *Trends Immunol.* **28**: 455-462.
 - SUTTERWALA, F. S., NOEL, G. J., SALGAME, P., et MOSSER, D. M. 1998. Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fcgamma receptor type I. *J. Exp. Med.* **188**: 217-222.
 - SZKARADKIEWICZ, A., JOPEK, A., et WYSOCKI, J. 2005. Effects of IL-12 and IL-18 on HBcAg-specific cytokine production by CD4 T lymphocytes of children with chronic hepatitis B infection. *Antiviral Res.* **66**: 23-27.
 - TAGAWA, Y., KAKUTA, S., et IWAKURA, Y. 1998. Involvement of Fas/Fas ligand system-mediated apoptosis in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *Eur. J. Immunol.* **28**: 4105-4113.
 - TAGUCHI, F., MASSA, P. T., et TER MEULEN, V. 1986. Characterization of a variant virus isolated from neural cell culture after infection of mouse coronavirus JHMV. *Virology.* **155**: 267-270.

- TAKANO, T., HOHDATSU, T., TODA, A., TANABE, M., et KOYAMA, H. 2007. TNF- α , produced by feline infectious peritonitis virus (FIPV)-infected macrophages, upregulates expression of type II FIPV receptor feline aminopeptidase N in feline macrophages. *Virology*. **364**: 64-72.
- TAKAYAMA, T., MORELLI, A. E., ONAI, N., HIRAO, M., MATSUSHIMA, K., TAHARA, H., et THOMSON, A. W. 2001. Mammalian and viral IL-10 enhance C-C chemokine receptor 5 but down-regulate C-C chemokine receptor 7 expression by myeloid dendritic cells: impact on chemotactic responses and in vivo homing ability. *J. Immunol.* **166**: 7136-7143.
- TAKEDA, K., HAYAKAWA, Y., VAN KAER, L., MATSUDA, H., YAGITA, H., et OKUMURA, K. 2000. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 5498-5503.
- TAKEDA, K., KAISHO, T., et AKIRA, S. 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**: 335-376.
- TAKEDA, K., SEKI, S., OGASAWARA, K., ANZAI, R., HASHIMOTO, W., SUGIURA, K., TAKAHASHI, M., SATOH, M., et KUMAGAI, K. 1996. Liver NK1.1+ CD4+ α β T cells activated by IL-12 as a major effector in inhibition of experimental tumor metastasis. *J. Immunol.* **156**: 3366-3373.
- TAKEI, F., BRENNAN, J., et MAGER, D. L. 1997. The Ly-49 family: genes, proteins and recognition of class I MHC. *Immunol. Rev.* **155**: 67-77.
- TAN, K., ZELUS, B. D., MEIJERS, R., LIU, J. H., BERGELSON, J. M., DUKE, N., ZHANG, R., JOACHIMIAK, A., HOLMES, K. V., et WANG, J. H. 2002. Crystal structure of murine sCEACAM1a[1,4]: a coronavirus receptor in the CEA family. *EMBO J.* **21**: 2076-2086.
- TANAKA, N., TATEMOTO, A., URABE, T., ONO, M., HIZUTA, A., NAOMOTO, Y., GOTOH, K., MOREIRA, L. F., et ORITA, K. 1993. Inhibition of liver

regeneration in mice following extended hepatectomy by transfusion of lymphokine activated killer cells. *Acta Med. Okayama.* **47**: 21-28.

- TANG, N. L., CHAN, P. K., WONG, C. K., TO, K. F., WU, A. K., SUNG, Y. M., HUI, D. S., SUNG, J. J., et LAM, C. W. 2005. Early enhanced expression of interferon-inducible protein-10 (CXCL-10) and other chemokines predicts adverse outcome in severe acute respiratory syndrome. *Clin. Chem.* **51**: 2333-2340.
- TARDIEU, M., BOESPFLUG, O., et BARBE, T. 1986. Selective tropism of a neurotropic coronavirus for ependymal cells, neurons, and meningeal cells. *J. Virol.* **60**: 574-582.
- TARDIEU, M., HERY, C., et DUPUY, J. M. 1980. Neonatal susceptibility to MHV3 infection in mice. II. Role of natural effector marrow cells in transfer of resistance. *J. Immunol.* **124**: 418-423.
- TAY, C. H., et WELSH, R. M. 1997. Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. *J. Virol.* **71**: 267-275.
- THIMME, R., BUKH, J., SPANGENBERG, H. C., WIELAND, S., PEMBERTON, J., STEIGER, C., GOVINDARAJAN, S., PURCELL, R. H., et CHISARI, F. V. 2002. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**: 15661-15668.
- THIMME, R., OLDACH, D., CHANG, K. M., STEIGER, C., RAY, S. C., et CHISARI, F. V. 2001. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J. Exp. Med.* **194**: 1395-1406.
- THOBE, B. M., FRINK, M., HILDEBRAND, F., SCHWACHA, M. G., HUBBARD, W. J., CHOUDHRY, M. A., et CHAUDRY, I. H. 2007. The role of MAPK in Kupffer cell toll-like receptor (TLR) 2-, TLR4-, and TLR9-mediated signaling following trauma-hemorrhage. *J. Cell. Physiol.* **210**: 667-675.

- THORNTON, A. M., et SHEVACH, E. M. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* **188**: 287-296.
- THORP, E., et GALLAGHER, T. 2004. Requirements for CEACAMs and cholesterol during murine coronavirus cell entry. *J. Virol.* **78**: 2682-2692.
- TIWARI, V., CLEMENT, C., DUNCAN, M. B., CHEN, J., LIU, J., et SHUKLA, D. 2004. A role for 3-O-sulfated heparan sulfate in cell fusion induced by herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* **85**: 805-809.
- TOOZE, J., TOOZE, S., et WARREN, G. 1984. Replication of coronavirus MHV-A59 in sac-cells: determination of the first site of budding of progeny virions. *Eur. J. Cell. Biol.* **33**: 281-293.
- TOSH, D., et AGIUS, L. 1995. Lactate and pyruvate stimulate the conversion of glucose to glycogen in hepatocytes by a mechanism that does not involve gluconeogenic flux. *Biochim. Biophys. Acta.* **1268**: 165-170.
- TROTTA, R., KANAKARAJ, P., et PERUSSIA, B. 1996. Fc gamma R-dependent mitogen-activated protein kinase activation in leukocytes: a common signal transduction event necessary for expression of TNF-alpha and early activation genes. *J. Exp. Med.* **184**: 1027-1035.
- TROTTA, R., PUORRO, K. A., PAROLI, M., AZZONI, L., ABEBE, B., EISENLOHR, L. C., et PERUSSIA, B. 1998. Dependence of both spontaneous and antibody-dependent, granule exocytosis-mediated NK cell cytotoxicity on extracellular signal-regulated kinases. *J. Immunol.* **161**: 6648-6656.
- TSENG, C. T., PERRONE, L. A., ZHU, H., MAKINO, S., et PETERS, C. J. 2005b. Severe acute respiratory syndrome and the innate immune responses: modulation of effector cell function without productive infection. *J. Immunol.* **174**: 7977-7985.

- TSENG, C. T. K., et KLIMPEL, G. R. 2002. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell function. *J. Exp. Med.* **195**: 43-49.
- TSENG, C., TSENG, J., et PERRONE, L. 2005a. Apical entry and release of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus in polarized Calu-3 lung epithelial cells. *J. Virol.* **79**: 9470-9479.
- TSUKAHARA, A., SEKI, S., IAI, T., MORODA, T., WATANABE, H., SUZUKI, S., TADA, T., HIRAIDE, H., HATAKEYAMA, K., et ABO, T. 1997. Mouse liver T cells : their change with aging and in comparison with peripheral T cells. *Hepatology.* **26**: 301-309.
- TSUTSUI, H., NAKANISHI, K., MATSUI, K., HIGASHINO, K., OKAMURA, H., MIYAZAWA, Y., et KANEDA, K. 1996. IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J. Immunol.* **157**: 3967-3973.
- TYRRELL, D. A., et ALMEIDA, J. D. 1967. Direct electron-microscopy of organ culture for the detection and characterization of viruses. *Arch. Ges. Virusforsch.* **22**: 417-425.
- TYRRELL, D. A. J., ALEXANDER, D. J., ALMEIDA, J. D., CUNNINGHAM, C. H., EASTERDAY, B. C., GARWES, D. J., HIERHOLZER, J. C., KAPIKIAN, A., MACNAUGHTON, M. R., et MCINTOSH, K. 1978. Coronaviridae: second report. *Intervirology.* **10**: 321-328.
- TYRRELL, D. A. J., ALMEIDA, J. D., CUNNINGHAM, C. H., DOWDLE, W. R., HOFSTAD, M. S., MCINTOSH, K., TAJIMA, M., ZAKSTELSKAYS, L. Y., EASTERDAY, B. C., KAPIKIAN, A., et BINGHAM, R. W. 1975. Coronaviridae. *Intervirology.* **5**: 76-82.
- TYRRELL, D. A. J., et BYNOE, M. L. 1965. Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. *Brit. Med. J.* **1**: 1467-1470.

- UCHIDA, T., KINOSHITA, M., FUKASAWA, M., HABU, Y., SHINOMIYA, N., et SEKI, S. 2007. IL-18 time-dependently modulates Th1/Th2 cytokine production by ligand-activated NKT cells. *Eur. J. Immunol.* **37**: 966-977.
- UHRIG, A., BANAFSCHE, R., KREMER, M., HEGENBARTH, S., HAMANN, A., NEURATH, M., GERKEN, G., LIMMER, A., et KNOLLE, P. A. 2005. Development and functional consequences of LPS tolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver. *J. Leukoc. Biol.* **77**: 626-633.
- UNTERHOLZNER, L., et BOWIE, A. G. 2008. The interplay between viruses and innate immune signaling: Recent insights and therapeutic opportunities. *Biochem. Pharmacol.* **75**: 589-602.
- UWATOKU, R., AKAIKE, K., YAMAGUCHI, K., KAWASAKI, T., ANDO, M., et MATSUNO, K. 2001. Asialoglycoprotein receptors on rat dendritic cells: possible roles for binding with Kupffer cells and ingesting virus particles. *Arch. Histol. Cytol.* **64**: 223-232.
- VANCE, R. E., KRAFT, J. R., ALTMAN, J. D., JENSEN, P. E., et RAULET, D. H. 1998. Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b). *J. Exp. Med.* **188**: 1841-1848.
- VASSAO, R. C., DE FRANCO, M. T., HARTZ, D., MODOLELL, M., SIPPEL, A., et PEREIRA, C. A. 2000. Down-regulation of Bgp1^a viral receptor by interferon-g is related to the antiviral state and resistance to mouse hepatitis virus 3 infection. *Virology.* **274**: 278-283.
- VENNEMA, H., GODEKE, G. J., ROSSEN, J. W., VOORHOUT, W. F., HORZINEK, M. C., OPSTELTEN, D. J., et ROTTIER, P. J. 1996. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO. J.* **15**: 2020-2028.

- VERMA, V., CHAKRAVARTI, A., et KAR, P. 2008. Cytokine Levels of TGF-beta, IL-10, and sTNFalphaRII in Type C Chronic Liver Disease. *Dig. Dis. Sci.* **53**: 2233-2237.
- VERNE, J., et HEBERT, S. 1964. Neoglucogenesis in hepatocytes cultivated in vitro. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* **158**: 1804-1807.
- VICENZI, E., CANDUCCI, F., PINNA, D., MANCINI, N., CARLETTI, S., LAZZARIN, A., BORDIGNON, C., POLI, G., et CLEMENTI, M. 2004. Coronaviridae and SARS-associated coronavirus strain HSR1. *Emerg. Infect. Dis.* **10**: 413-418.
- VIDIGAL, P. G., GERMER, J. J., et ZEIN, N. N. 2002. Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin. *J. Hepatol.* **36**: 271-277.
- VIGNALI, D. A., COLLISON, L. W., et WORKMAN, C. J. 2008. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* **8**: 523-532.
- VIGOUROUX, S., YVON, E., BIAGI, E., et BRENNER, M. K. 2004. Antigen-induced regulatory T cells. *Blood.* **104**: 26-33.
- VOSSHENRICH, C. A., et DI SANTO, J. P. 2002. Interleukin signaling. *Curr. Biol.* **12**: R760-R763.
- VOSSHENRICH, C. A., RANSON, T., SAMSON, S. I., CORCUFF, E., COLUCCI, F., ROSMARAKI, E. E., et DI SANTO, J. P. 2005. Roles for common cytokine receptor gamma-chain-dependent cytokines in the generation, differentiation, and maturation of NK cell precursors and peripheral NK cells in vivo. *J. Immunol.* **174**: 1213-1221.
- WAGENER, C., et ERGUN, S. 2000. Angiogenic properties of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1. *Exp. Cell. Res.* **261**: 19-24.

- WALKER, W., et ROTONDO, D. 2004. Prostaglandin E2 is a potent regulator of interleukin-12- and interleukin-18-induced natural killer cell interferon-gamma synthesis. *Immunology*. **111**: 298-305.
- WALSH, A. B., LODOEN, M. B., EDWARDS, R. A., LANIER, L. L., et LANE, T. E. 2008. Evidence for differential roles for NKG2D receptor signalling in innate host defense against coronavirus-induced neurological and liver disease. *J. Virol.* **82**: 3021-3030.
- WANG, J., XU, J. W., ZHANG, W. C., WEI, H. M. et TIAN, Z. G. 2005. TLR3 Ligand-induced accumulation of activated splenic natural killer cells into liver. *Cell. Mol. Immunol.* **2**: 449-453.
- WANG, W., YE, L., YE, L., LI, B., GAO, B., ZENG, Y., KONG, L., FANG, X., ZHENG, H., WU, Z., et SHE, Y. 2007. Up-regulation of IL-6 and TNF-alpha induced by SARS-coronavirus spike protein in murine macrophages via NF-kappaB pathway. *Virus Res.* **128**: 1-8.
- WARIS, G., et SIDDIQUI, A. 2005. Hepatitis C virus stimulates the expression of cyclooxygenase-2 via oxidative stress: role of prostaglandin E2 in RNA replication. *J. Virol.* **79**: 9725-9734.
- WASKIEWICZ, A. J., JOHNSON, J. C., PENN, B., MAHALINGAM, M., KIMBALL, S. R., et COOPER, J. A. 1999. Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 1871-1880.
- WATANABE, H., OHTSUKA, K., KIMURA, M., IKARASHI, Y., OHMORI, K., KUSUMI, A., OHTEKI, T., SEKI, S., et ABO, T. 1992. Details of an isolation method for hepatic lymphocytes in mice. *J. Immunol.* **146**: 145-154.
- WATANABE, H., WATANABE, H., MIYAJI, C., KAWACHI, Y., IIAI, T., OHTSUKA, K., IWANGE, T., TAKAHASHI-IWANAGA, H., et ABO, T. 1995. Relationship between intermediate TCR cells and NK1.1+T cells in various immune

organs. NK1.1+ T cells are present within a population of intermediate TCR cells. *J. Immunol.* **155**: 2972-2983.

- WATANABE, R., SAWICKI, S. G., et TAGUCHI, F. 2007. Heparan sulfate is a binding molecule but not a receptor for CEACAM1-independent infection of murine coronavirus. *Virology.* **366**: 16-22.
- WATT, S. M., TEIXEIRA, A. M., ZHOU, G. Q., DOYONNAS, R., ZHANG, Y., GRUNERT, F., BLUMBERG, R. S., KUROKI, M., SKUNITZ, K. M., et BATES, P. A. 2001. Homophilic adhesion of human CEACAM1 involves N-terminal domain interactions: structural analysis of the binding site. *Blood.* **98**: 1469-1479.
- WEBB, L. M., EHRENGRUBER, M. U., CLARK-LEWIS, I., BAGGIOLINI, M., et ROT, A. 1993. Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 7158-7162.
- WEI, S., GAMERO, A. M., LIU, J. H., DAULTON, A. A., VALKOV, N. I., TRAPANI, J. A., LARNER, A. C., WEBER, M. J., et DJEU, J. Y. 1998. Control of lytic function by mitogen-activated protein kinase/extracellular regulatory kinase 2 (ERK2) in a human natural killer cell line: identification of perforin and granzyme B mobilization by functional ERK2. *J. Exp. Med.* **187**: 1753-1765.
- WEI, S., GILVARY, D. L., CORLISS, B. C., SEBTI, S., SUN, J., STRAUS, D. B., LEIBSON, P. J., TRAPANI, J. A., HAMILTON, A. D., WEBER, M. J., et DJEU, J. Y. 2000. Direct tumor lysis by NK cells uses a Ras-independent mitogen-activated protein kinase signal pathway. *J. Immunol.* **165**: 3811-3819.
- WEINER, H. L., FRIEDMAN, A., MILLER, A., KHOURY, S. J., AL-SABBAGH, A., SANTOS, L., SAYEGH, M., NUSSENBLATT, R. B., TRENTHAM, D. E., et HAFLER, D. A. 1994. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu. Rev. Immunol.* **12**: 809-837.

- WIEGARD, C., FRENZEL, C., HERKEL, J., KALLEN, K. J., SCHMITT, E., et LOHSE A. W. 2005. Murine liver antigen presenting cells control suppressor activity of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hepatology*. **42**: 193-199.
- WILLIAMS, N. S., KLEM, J., PUZANOV, I. J., SIVAKUMAR, P. V., BENNETT, M., et KUMAR, V. 1999. Differentiation of NK1.1+, Ly49+ NK cells from flt3+ multipotent marrow progenitor cells. *J. Immunol*. **163**: 2648-2656.
- WILLIAMS, N. S., MOORE, T. A., SCHATZLE, J. D., PUZANOV, I. J., SIVAKUMAR, P. V., ZLOTNIK, A., BENNETT, M., et KUMAR, V. 1997. Generation of lytic natural killer 1.1+ly49- cells from multipotential murine bone marrow progenitor in a stroma free culture: definition of cytokine requirements and developmental intermediates. *J. Exp. Med*. **186**: 1609-1614.
- WONG, C. K., CHEUNG, P. F., IP, W. K., et LAM, C. W. 2007. Intracellular signaling mechanisms regulating Toll-like receptor-mediated activation of eosinophils. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol*. **37**: 85-96.
- WONG, C. K., LAM, C. W., WU, A. K., IP, W. K., LEE, N. L., CHAN, I. H., LIT, L. C., HUI, D. S., CHAN, M. H., CHUNG, S. S., et SUNG, J. J. 2004. Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. *Clin. Exp. Immunol*. **136**: 95-103.
- WU, J., LU, M., MENG, Z., TRIPPLER, M., BROERING, R., SZCZEPONEK, A., KRUX, F., DITTMER, U., ROGGENDORF, M., GERKEN, G., et SCHLAAK, J. F. 2007. Toll-like receptor-mediated control of HBV replication by nonparenchymal liver cells in mice. *Hepatology*. **46**: 1769-1778.
- XIE, G. Q., JIANG, J. X., CHEN, Y. H., LIU, D. W., ZHU, P. F., et WANG, Z. G. 2002. Induction of acute hepatic injury by endotoxin in mice. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int*. **1**: 558-564.
- YAMAMOTO, M., SATO, S., HEMMI, H., HOSHINO, K., KAISHO, T., SANJO, H., TAKEUCHI, O., SUGIYAMA, M., OKABE, M., TAKEDA, K., et AKIRA, S.

- 2003a. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. **301**: 640-643.
- YAMAMOTO, M., SATO, S., HEMMI, H., SANJO, H., UEMATSU, S., KAISHO, T., HOSHINO, K., TAKEUCHI, O., KOBAYASHI, M., FUJITA, T., TAKEDA, K., et AKIRA, S. 2002. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*. **420**: 324-329.
 - YAMAMOTO, M., SATO, S., HEMMI, H., UEMATSU, S., HOSHINO, K., KAISHO, T., TAKEUCHI, O., TAKEDA, K., et AKIRA, S. 2003b. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.* **4**: 1144-1150.
 - YILLA, M., HARCOURT, B. H., HICKMAN, C. J., MCGREW, M., TAMIN, A., GOLDSMITH, C. S., BELLINI, W. J., et ANDERSON, L. J. 2005. SARS-coronavirus replication in human peripheral monocytes/macrophages. *Virus Res.* **107**: 93-101.
 - YOKOMORI, K., BANNER, L. R., et LAI, M. M. 1991. Heterogeneity of gene expression of the hemagglutinin-esterase (HE) protein of murine coronaviruses. *Virology*. **183**: 647-657.
 - YOKOYAMA, W. M. 1995. Natural killer cell receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 110-120.
 - YOON, S. R., CHUNG, J. W., et CHOI, I. 2007. Development of natural killer cells from hematopoietic stem cells. *Mol. Cells*. **24**: 1-8.
 - YOU, Q., CHENG, L., KEDI, R. M., et JU, C. 2008. Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. *Hepatology*. 2008. **48**: 978-990.
 - YU, G. Y., et LAI, M. 2005. Ubiquitin-proteasome system facilitates the transfer of a murine coronavirus from endosome to cytoplasm during virus entry. *J. Virol.* **79**: 644-648.

- YU, Q., CHOW, E. M., WONG, H., GU, J., MANDELBOIM, O., GRAY-OWEN, S. D., et OSTROWSKI, M. A. 2006. CEACAM1 (CD66a) promotes human monocyte survival via a phosphatidylinositol 3-kinase- and AKT-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **281**: 39179-39193.
- YU, S., NAKAFUSA, Y., et FLYE, M. W. 1994. Portal vein administration of donor cells promotes peripheral allospecific hyporesponsiveness and graft tolerance. *Surgery.* **116**: 229-234.
- ZELUS, B. D., SCHICKLI, J. H., BLAU, D. M., WEISS, S. R. et HOLMES, K. V. 2003. Conformational changes in the spike glycoprotein of murine coronavirus are induced at 37 degrees C either by soluble murine CEACAM1 receptors or by pH 8. *J. Virol.* **77**: 830-840.
- ZHOU, H., et PERLMAN, S. 2007. Mouse hepatitis virus does not induce beta interferon synthesis and does not inhibit its induction by double-stranded RNA. *J. Virol.* **81**: 568-574.
- ZORZITTO, J., GALLIGAN, C. L., UENG, J. J., et FISH, E. N. 2006. Characterization of the antiviral effects of interferon-alpha against a SARS-like coronavirus infection in vitro. *Cell Res.* **16**: 220-229.

6- ANNEXES

MURINE VIRAL HEPATITIS INVOLVES NK CELL DEPLETION ASSOCIATED
WITH VIRUS-INDUCED APOPTOSIS

M. LEHOUX, A. JACQUES, S. LUSIGNAN, & L. LAMONTAGNE

Département de microbiologie et d'immunologie

Université de Montréal, Canada

Publié dans la revue *Clinical and Experimental Immunology* (2004)

Volume 137, pp 41-51

INTRAHEPATIC ENDOTHELIAL AND KUPFFER CELLS INVOLVED IN
IMMUNOSUPPRESSIVE CYTOKINES AND NK/NK-T CELL DISORDERS IN THE
VIRAL ACUTE HEPATITIS

A. JACQUES, C. BLEAU, J.P. MARTIN & L. LAMONTAGNE

Département de microbiologie et d'immunologie

Université de Montréal, Canada

Publié dans la revue *Clinical and Experimental Immunology* (2008)

Volume 152, pp 298-310