

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Effets du virus MHV3 sur les propriétés inflammatoires des cellules
endothéliales cérébrales et des macrophages myéloïdes**

par

Annie Gosselin

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en microbiologie et immunologie

Juillet, 2008

© Annie Gosselin, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Effets du virus MHV3 sur les propriétés inflammatoires des cellules
endothéliales cérébrales et des macrophages myéloïdes**

Présenté par :
Annie Gosselin

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Guy Lemay
(Président-rapporteur)

Dre Lucie Lamontagne
(Directrice de recherche)

Dre Tatiana Scorza
(Membre du jury)

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Le virus de l'hépatite murine (MHV) sert de modèle animal pour l'étude des désordres immunologiques induit par les encéphalites virales. L'infection des souris susceptibles (C57BL/6) avec le sérotype MHV3 entraîne une hépatite causant la mort en 3 à 5 jours, alors que l'infection des souris de lignées semi-susceptibles (SJL) s'exprime par une hépatite aiguë qui se résorbe, mais qui est suivie d'une maladie neurologique chronique et d'une immunodéficience progressive. L'infection des souris susceptibles avec le sérotype MHV-A59 provoque aussi une hépatite suivie d'une méningo-encéphalite dans les deux premières semaines d'infection. Les souris susceptibles et semi-susceptibles diffèrent génétiquement par l'expression de deux allèles distincts de la molécule CEACAM-1, le récepteur cellulaire pour les virus MHV. Les cellules endothéliales cérébrales participent à la réponse immunitaire antivirale et peuvent favoriser le recrutement de macrophages au site d'infection. L'objectif principal de ce travail est de vérifier si les cellules endothéliales cérébrales sont permissives à l'infection virale, ce qui pourrait entraîner la modulation des propriétés inflammatoires de ces cellules ainsi que des macrophages myéloïdes au contact avec les virus MHV. Ces hypothèses ont été étudiées à l'aide de cellules endothéliales cérébrales et de macrophages myéloïdes de souris C57BL/6, SJL et *Ceacam-1a*^{-/-} infectés avec le virus pathogène plutôt hépatotrope L2-MHV3, un variant isolé dans le cerveau de souris chroniquement infectées (C43-MHV3) ou le sérotype plutôt neurotrope MHV-A59. Les résultats ont montré que les cellules endothéliales cérébrales de souris C57BL/6 et *Ceacam-1a*^{-/-} étaient permissives aux virus L2-MHV3 et C43-MHV3, mais pas au MHV-A59, alors que les cellules endothéliales cérébrales de souris SJL n'étaient permissives à aucun de ces virus. Nous avons montré qu'au contact avec les virus, les propriétés inflammatoires des cellules endothéliales étaient modulées et ce, même en absence du récepteur CEACAM-1a à la surface cellulaire. La production d'IL-6 et de PGE₂ par les cellules endothéliales cérébrales de souris C57BL/6 infectées par les trois souches virales était en relation inverse avec la permissivité des cellules à l'infection. De plus, les trois virus étudiés ont diminué la production de PGE₂ induite par l'ajout de TNF- α chez les cellules endothéliales de souris SJL et *Ceacam-1a*^{-/-}. L'infection des macrophages myéloïdes par les trois virus a également entraîné l'inhibition de la production de cytokines, particulièrement chez les cellules de souris C57BL/6. L'héparine et/ou un inhibiteur du TLR2 a entraîné une inhibition additive de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-10 alors qu'il a partiellement annulé la diminution d'IL-12 induite par les virus. La capacité métabolique des lymphocytes spléniques de souris C57BL/6 a été diminuée lorsque ces cellules ont été mises en contact avec les substances solubles produites par les macrophages infectés, alors que le contraire a été observé chez les lymphocytes de souris SJL. Ces travaux démontrent le rôle important des interactions récepteurs – virus sur les fonctions des cellules endothéliales cérébrales ou macrophagiques.

MOTS CLÉS : Virus MHV, cellules endothéliales, macrophages myéloïdes, CEACAM-1, TLR2, héparane sulfate.

ABSTRACT

Mouse hepatitis virus (MHV) is an animal model to study immunological disorders related to viral encephalitis. Susceptible mice infected with the pathogenic virus MHV3 develop an acute hepatitis leading to death in 3 to 5 days, whereas the infection of semi-susceptible mice induces an acute hepatitis which is resolved, but is followed by chronic neurological disease and a progressive immunodeficiency. MHV-A59 infected susceptible mice also develop an hepatitis that is followed by a meningo-encephalitis in the first two weeks of infection. Susceptible and semi-susceptible mice differ genetically by the expression of two distinct alleles of the CEACAM-1 molecule, the principal MHV receptor. Brain endothelial cells are implicated in the antiviral immune response and may favor macrophages recruitment to the site of infection. The aim of this work was to study the permissivity of brain endothelial cells to viral replication. This permissivity could modify the inflammatory properties of these cells and of bone marrow macrophages as well. These hypothesis were verified by infecting brain endothelial cells and bone marrow macrophages from C57BL/6, SJL and *Ceacam-1a*^{-/-} mice with the very pathogenic and mostly hepatotropic L2-MHV3 virus, with C43-MHV3 (a virus isolated from the brain of chronically infected mice) or with the mostly neurotropic MHV-A59 virus. Our results showed that endothelial cells from C57BL/6 and *Ceacam-1a*^{-/-} mice were permissive to L2-MHV3 and C43-MHV3 viruses, but not to MHV-A59, and that endothelial cells from SJL mice were permissive to none of these viruses. We showed that the inflammatory properties of endothelial cells were modified following contact with the viruses, even in the absence of the CEACAM-1a molecule. IL-6 and PGE₂ production by C57BL/6 mouse endothelial cells inversely correlated with cell permissivity to infection. Moreover, PGE₂ induction by exogenous addition of TNF- α was diminished by the three viruses in SJL and *Ceacam-1a*^{-/-} endothelial cells. Infection of bone marrow macrophages has also inhibited cytokine production, especially in C57BL/6 mice cells. Heparin and/or a TLR2 inhibitor amplified the inhibition of TNF- α , IL-6 and IL-10, but partially blocked the virus-induced inhibition of IL-12. Also, C57BL/6 splenic lymphocytes metabolic activity was diminished when these cells were in the presence of soluble substances produced by infected macrophages, whereas an opposite effect was observed in SJL splenic lymphocytes. This work illustrates the important role of virus - receptor interactions on endothelial cell functions.

KEY WORDS : MHV viruses, endothelial cells, bone-marrow macrophages, CEACAM-1, TLR2, heparan sulfate.

TABLE DES MATIÈRES

Page d'identification du jury.....	ii
Résumé en français	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des figures	xi
Liste des abréviations	xiv
Remerciements.....	xv
Dédicace	xvi
1- INTRODUCTION	1
2- REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	4
2.1- Le système nerveux central.....	5
2.1.1- Les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes	5
2.1.2- Les cellules de la microglie.....	6
2.1.2.1- Ontogénie des cellules de la microglie.....	6
2.1.2.2- Caractérisation phénotypique des cellules de la microglie	7
2.2- La barrière hémato-encéphalique.....	8
2.2.1- Structure	8
2.2.2- Caractéristiques des cellules endothéliales	9
2.2.2.1- Origine et ontogénie des cellules endothéliales	11
2.2.2.2- Caractérisation phénotypique des cellules endothéliales	12
2.3- Les encéphalites virales humaines	13
2.3.1- L'encéphalite herpétique.....	13
2.3.2- L'encéphalite par le virus de la rougeole	13
2.3.3- Les encéphalites lors du SIDA.....	14
2.4- La réponse immunitaire dans le SNC.....	16
2.4.1- Le concept de tolérance immunologique en condition normale	16
2.4.2- Les cellules participant à la réponse immunitaire dans le SNC et au niveau de la barrière hémato-encéphalique.....	18
2.4.2.1- Les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes	18
2.4.2.2- Les cellules de la microglie.....	19
2.4.2.3- Les cellules endothéliales cérébrales.....	20
2.4.2.4- Les monocytes / macrophages et les lymphocytes.....	21
2.5- Nature des récepteurs de la surface des cellules du SNC impliqués dans la production de cytokines inflammatoires	21
2.5.1- Les récepteurs Toll (TLR)	22

2.5.2-	Les régions riches en héparane sulfate.....	23
2.6-	Nature et fonctions des cytokines générées durant l'infection virale.	24
2.6.1-	Le facteur de nécrose tumorale (TNF- α).....	25
2.6.2-	L'interleukine 6 (IL-6).....	28
2.6.3-	L'interleukine 10 (IL-10).....	29
2.6.4-	L'interleukine 12 (IL-12).....	30
2.6.5-	La prostaglandine E ₂ (PGE ₂).....	32
2.6.6-	Les interférons (IFN).....	33
2.6.6.1-	Les interférons de type I.....	33
2.6.6.2-	L'interféron gamma.....	34
2.7-	La réponse immunitaire antivirale dans le SNC	35
2.8-	Un modèle d'étude : Les coronavirus	36
2.8.1-	Les coronavirus murins.....	36
2.8.2-	Maladies induites par les coronavirus chez diverses espèces animales incluant l'homme	38
2.8.3-	Étapes de la réplication virale	38
2.9-	Le virus de l'hépatite murine (MHV).....	39
2.9.1-	Caractéristiques des MHV	39
2.9.2-	Diversité des sérotypes et des pathologies.....	40
2.9.3-	Pathogenèse du MHV-A59.....	40
2.9.4-	Pathogenèse du MHV-JHM.....	41
2.9.5-	Le sérotype MHV3	42
2.9.5.1-	Pathogenèse du MHV3.....	42
2.9.5.2-	Les caractéristiques des variants du MHV3 isolés du SNC.....	42
2.9.6-	Susceptibilité génétique de l'hôte	43
2.9.7-	Le récepteur viral : la molécule CEACAM-1	44
2.9.8-	Le tropisme cellulaire des virus MHV.....	45
2.9.8.1-	Le virus MHV3	45
2.9.8.2-	Les virus MHV-A59 et MHV-JHM.....	46
2.9.9-	La réponse immunitaire anti-virale lors des infections aux virus MHV....	47
2.9.9.1-	L'infection aiguë	47
2.9.9.2-	L'infection chronique.....	49
2.9.9.3-	La persistance virale.....	50
2.10-	Hypothèses	51
3-	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	54
3.1-	Souris	55
3.2-	Virus	55
3.3-	Titrage viral	55

3.4- Prélèvement des organes et isolement des cellules.....	56
3.4.1- Prélèvement des cellules myéloïdes et isolement des macrophages.....	56
3.4.2- Prélèvement des cellules spléniques et isolement des cellules lymphocytaires.....	57
3.4.3- Culture des lymphocytes spléniques en contact direct avec des macrophages myéloïdes ou en godets (transwells).....	57
3.4.4- Isolement des microvaisseaux cérébraux.....	58
3.4.5- Culture des cellules endothéliales cérébrales.....	59
3.5- Lignées cellulaires.....	59
3.5.1- Cellules L2.....	59
3.6- Infections virales.....	59
3.7- Traitement des cellules endothéliales avec du TNF-α.....	60
3.8- Traitements avec de l'héparine, un inhibiteur de TLR2 et un anticorps AgB10.....	60
3.9- Évaluation du métabolisme cellulaire MTS/PMS.....	61
3.10- Doubles immunomarquages et analyses cytofluorométriques.....	61
3.10.1- Mesure de l'apoptose des lymphocytes spléniques.....	61
3.10.2- Phénotypage des cellules endothéliales.....	61
3.11- Microscopie confocale.....	62
3.11.1- Culture et infection des cellules.....	62
3.11.2- Fixation des cellules, immunomarquages et observation au microscope confocal.....	62
3.12- Quantification de la production de cytokines dans les surnageants de culture.....	63
3.13- Analyses statistiques.....	63
4- RÉSULTATS.....	64
4.1- Cellules endothéliales.....	65
4.1.1- Production des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux.....	65
4.1.2- Caractérisation phénotypique des cellules endothéliales en culture <i>in vitro</i>	66
4.1.3- Permissivité des cellules endothéliales cérébrales de souris C57BL/6 aux virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59.....	66
4.1.4- Effets des infections virales sur la production de cytokines par les cellules endothéliales de souris C57BL/6.....	69
4.1.4.1- Production d'interféron alpha (IFN- α).....	69
4.1.4.2- Production d'interleukine-6 (IL-6).....	69

4.1.4.3-	Production de prostaglandine E ₂ (PGE ₂).....	72
4.1.4.4-	Production d'interleukine-10 (IL-10).....	74
4.1.5-	Permissivité des cellules endothéliales cérébrales de souris SJL aux virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59.....	74
4.1.6-	Effets des infections virales sur la production de cytokines par les cellules endothéliales de souris SJL.....	74
4.1.6.1-	Production d'interféron alpha (IFN- α).....	76
4.1.6.2-	Production d'interleukine-6 (IL-6).....	76
4.1.6.3-	Production de prostaglandine E ₂ (PGE ₂).....	79
4.1.7-	Permissivité des cellules endothéliales cérébrales de souris <i>Ceacam-1a</i> ^{-/-} aux virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59	79
4.1.8-	Effets des infections virales sur la production de cytokines par les cellules endothéliales de souris <i>Ceacam-1a</i> ^{-/-}	79
4.1.8.1-	Production d'interféron alpha (IFN- α).....	82
4.1.8.2-	Production d'interleukine-6 (IL-6).....	82
4.1.8.3-	Production de prostaglandine E ₂ (PGE ₂).....	82
4.1.9-	Rôle des régions héparanes sulfates dans la production d'IL-6 par les cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris C57BL/6 infectées <i>in vitro</i> par les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59	85
4.1.10-	Rôle du récepteur TLR2 dans la production d'IL-6 par les cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris C57BL/6.....	85
4.1.11-	Effets de l'ajout de TNF- α sur la production d'IL-6 et de PGE ₂ par les cellules endothéliales cérébrales de souris C57BL/6.....	88
4.1.11.1-	L'IL-6.....	88
4.1.11.2-	La PGE ₂	88
4.1.12-	Effets de l'ajout de TNF- α sur la production d'IL-6 et de la PGE ₂ par les cellules endothéliales cérébrales de souris SJL	90
4.1.12.1-	Interleukine-6 (IL-6)	90
4.1.12.2-	Prostaglandine E ₂ (PGE ₂).....	93
4.1.13-	Effet de l'ajout de TNF- α sur la production d'IL-6 et de PGE ₂ par les cellules endothéliales cérébrales de souris <i>Ceacam-1a</i> ^{-/-}	93
4.1.13.1-	Interleukine-6 (IL-6)	93
4.1.13.2-	Prostaglandine E ₂ (PGE ₂).....	93
4.2-	Effets des infections virales sur les propriétés inflammatoires des macrophages myéloïdes	97
4.2.1-	Production de TNF- α par les macrophages de la moelle osseuse	97
4.2.2-	Production d'IL-6 par les macrophages de la moelle osseuse	97
4.2.3-	Production d'IL-10 par les macrophages de la moelle osseuse	99
4.2.4-	Production d'IL-12 par les macrophages de la moelle osseuse	99
4.2.5-	Implication des récepteurs CEACAM-1a, TLR2 et héparanes sulfates dans l'inhibition de la production de cytokines macrophagiques.	99
4.2.6-	Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages de moelle osseuse en présence d'anticorps AgB10 bloquant le récepteur CEACAM-1a chez la souris C57BL/6.....	103

4.2.7-	Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages de moelle osseuse de souris C57BL/6 en présence d'héparine.....	103
4.2.8-	Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages de moelle osseuse de souris C57BL/6 en présence d'un inhibiteur du TLR2	105
4.2.9-	Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages de moelle osseuse de souris C57BL/6 en présence d'héparine et d'un inhibiteur du TLR2	108
4.2.10-	Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages de moelle osseuse de souris SJL en présence d'héparine	108
4.2.11-	Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages de moelle osseuse de souris SJL en présence d'un inhibiteur du TLR2 ..	111
4.2.12-	Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages de moelle osseuse de souris SJL en présence d'héparine et d'un inhibiteur du TLR2	111
4.2.13-	Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages de moelle osseuse de souris <i>Ceacam-1a</i> ^{-/-} en présence d'héparine	113
4.2.14-	Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages de moelle osseuse de souris <i>Ceacam-1a</i> ^{-/-} en présence d'un inhibiteur du TLR2	116
4.2.15-	Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages de moelle osseuse de souris <i>Ceacam-1a</i> ^{-/-} en présence d'héparine et d'un inhibiteur du TLR2	116
4.3-	Effets des macrophages infectés sur l'activité des lymphocytes.....	119
4.3.1-	Activité métabolique des lymphocytes de souris C57BL/6 ou SJL en contact direct ou indirect avec des macrophages infectés.	119
4.3.2-	Pourcentage d'apoptose des lymphocytes de souris C57BL/6 ou SJL en contact direct ou indirect avec des macrophages infectés.....	120
4.3.3-	Interaction entre des macrophages myéloïdes infectés et des lymphocytes B spléniques.....	123
5-	DISCUSSION.....	126
5.1-	Cellules endothéliales	127
5.1.1-	Permissivité des cellules endothéliales	127
5.1.2-	Anomalies fonctionnelles des cellules endothéliales infectées avec les différents virus	129
5.1.3-	Effets du récepteur CEACAM-1a sur la permissivité des cellules endothéliales à l'infection virale et sur la production de cytokines.....	130
5.1.4-	Effets des récepteurs TLR2 et héparanes sulfates des cellules endothéliales sur la production de cytokines	134
5.1.5-	Effets de la stimulation par le TNF- α sur la production d'IL-6 et de PGE ₂ par les cellules endothéliales.....	135
5.2-	Macrophages myéloïdes	137

5.2.1-	Effets de la molécule CEACAM-1 dans la production de cytokines par les macrophages avec les différents virus	137
5.2.2-	Effets des récepteurs TLR2 et héparanes sulfates sur la production de cytokines par les macrophages infectés	138
5.2.3-	Effets de l'infection des macrophages sur leur fonctions immunomodulatrices.....	140
5.3-	La maladie neurologique induite par le MHV3.....	142
5.4-	Conclusion et développements futurs	143
6-	RÉFÉRENCES	145

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure de la barrière hémato-encéphalique.....	9
Figure 2. Structure d'un coronavirus.....	37
Figure 3. Effets cytopathiques engendrés par l'infection des cellules L2 par les virus MHV.....	56
Figure 4. Caractérisation des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris C57BL/6.....	67
Figure 5. Production de virus infectieux par les cellules endothéliales de souris C57BL/6.....	68
Figure 6. Production d'IFN- α par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris C57BL/6 infectées.....	70
Figure 7. Production d'IL-6 par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris C57BL/6 infectées.....	71
Figure 8. Production de PGE ₂ par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris C57BL/6 infectées.....	73
Figure 9. Production d'IL-10 par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris C57BL/6 infectées.....	75
Figure 10. Production d'IFN- α par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris SJL infectées.....	77
Figure 11. Production d'IL-6 par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris SJL infectées.....	78
Figure 12. Production de PGE ₂ par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris SJL infectées.....	80
Figure 13. Production de virus infectieux par les cellules endothéliales de souris <i>Ceacam-1a</i> ^{-/-} infectées.....	81
Figure 14. Production d'IL-6 par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris <i>Ceacam-1a</i> ^{-/-} infectées.....	83
Figure 15. Production de PGE ₂ par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris <i>Ceacam-1a</i> ^{-/-} infectées.....	84
Figure 16. Effet de l'héparine sur la production d'IL-6 par les cellules endothéliales cérébrales de souris C57BL/6 infectées.....	86

Figure 17. Effet d'un inhibiteur du TLR2 sur la production d'IL-6 par les cellules endothéliales cérébrales de souris C57BL/6 infectées.	87
Figure 18. Production d'IL-6 par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris C57BL/6 en présence de TNF- α	89
Figure 19. Production de PGE ₂ par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris C57BL/6 en présence de TNF- α	91
Figure 20. Production d'IL-6 par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris SJL en présence de TNF- α	92
Figure 21. Production de PGE ₂ par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris SJL en présence de TNF- α	94
Figure 22. Production d'IL-6 par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris <i>Ceacam-1a</i> ^{-/-} en présence de TNF- α	95
Figure 23. Production de PGE ₂ par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris <i>Ceacam-1a</i> ^{-/-} en présence de TNF- α	96
Figure 24. Production de TNF- α par les macrophages de la moelle osseuse de souris C57BL/6, SJL et <i>Ceacam-1a</i> ^{-/-} infectés.	98
Figure 25. Production d'IL-6 par les macrophages de la moelle osseuse de souris C57BL/6, SJL et <i>Ceacam-1a</i> ^{-/-} infectés.	100
Figure 26. Production d'IL-10 par les macrophages de la moelle osseuse de souris C57BL/6, SJL et <i>Ceacam-1a</i> ^{-/-} infectés.	101
Figure 27. Production d'IL-12 par les macrophages de la moelle osseuse de souris C57BL/6, SJL et <i>Ceacam-1a</i> ^{-/-} infectés.	102
Figure 28. Production de cytokines par les macrophages de la moelle osseuse de souris C57BL/6 infectés en présence d'un anticorps anti-CEACAM-1a.	104
Figure 29. Production de cytokines par les macrophages de la moelle osseuse de souris C57BL/6 infectés en présence d'héparine.	106
Figure 30. Production de cytokines par les macrophages de la moelle osseuse de souris C57BL/6 infectés en présence d'un inhibiteur du TLR2.	107

Figure 31. Production de cytokines par les macrophages de la moelle osseuse de souris C57BL/6 infectés en présence d'héparine et d'un inhibiteur du TLR2.	109
Figure 32. Production de cytokines par les macrophages de la moelle osseuse de souris SJL infectés en présence d'héparine.	110
Figure 33. Production de cytokines par les macrophages de la moelle osseuse de souris SJL infectés en présence d'un inhibiteur du TLR2.	112
Figure 34. Production de cytokines par les macrophages de la moelle osseuse de souris SJL infectés en présence d'héparine et d'un inhibiteur du TLR2.	114
Figure 35. Production de cytokines par les macrophages de la moelle osseuse de souris <i>Ceacam-1a</i> ^{-/-} infectés en présence d'héparine.	115
Figure 36. Production de cytokines par les macrophages de la moelle osseuse de souris <i>Ceacam-1a</i> ^{-/-} infectés en présence d'un inhibiteur du TLR2.	117
Figure 37. Production de cytokines par les macrophages de la moelle osseuse de souris <i>Ceacam-1a</i> ^{-/-} infectés en présence d'héparine et d'un inhibiteur du TLR2.	118
Figure 38. Activité métabolique des lymphocytes murins en contact direct ou indirect (transwell) avec des macrophages infectés.	121
Figure 39. Apoptose des lymphocytes murins en contact direct ou indirect (transwell) avec des macrophages infectés.	122
Figure 40. Interactions entre des lymphocytes B murins et des macrophages syngéniques infectés.	124

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
CEACAM	: molécule d'adhésion cellulaire de l'antigène carcino-embryonnaire (« Carcino-embryonic antigen cell adhesion molecule »)
CMH-I/II	: Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I / II
HSP	: Protéine de choc thermique (« Heat Shock Protein »)
HSPG	: Héparane sulfate protéoglycane
HSV	: Virus Herpès Simplex
ICAM	: Molécule d'adhésion intercellulaire (« Intercellular adhesion molecule »)
IFN	: Interféron
IL	: Interleukine
MHV	: Virus d'hépatite murine
MTS/PMS	: 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H- tétrazolium / phénazine méthosulfate
NO	: Oxyde nitrique
PAMP	: Motif moléculaire associé aux pathogènes (« Pathogen associated molecular pattern »)
PBS	: Tampon phosphate salin
PECAM	: Molécule d'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales (« Platelet-endothelial cell adhesion molecule »)
PG	: Prostaglandine
PRR	: Récepteur de reconnaissance de motifs (« Pattern recognition receptor »)
SIDA	: Syndrome de l'immunodéficience acquise
SNC	: Système nerveux central
SVF	: Sérum de veau foetal
TLR	: Récepteur toll (« Toll like receptor »)
TNF	: Facteur de nécrose tumorale (« Tumor necrosis factor »)
VCAM	: Molécule d'adhésion des cellules vasculaires (« Vascular cell adhesion molecule »)
VIH	: Virus de l'immunodéficience humaine

REMERCIEMENTS

J'aimerais grandement remercier ma directrice de recherche, Dre Lucie Lamontagne, pour m'avoir si généreusement encadrée et appuyée tout au long de ce travail, ainsi que le CRSNG pour leur appui financier.

Je voudrais également souligner l'aide scientifique et technique apporté par Christian Bleau, agent de recherche au laboratoire, qui a grandement facilité la réalisation de ce projet de recherche. Merci aussi à tous ceux que j'ai côtoyé durant mes études, particulièrement Alexandre Jacques pour tous ses judicieux conseils et Alexia Monges pour ses encouragements.

Merci à ma patronne Petronela pour sa compréhension et sa flexibilité dans les horaires de travail durant toute la période de rédaction de ce mémoire.

Infiniment merci à mes parents, qui m'ont toujours encouragée à atteindre mes buts et dont l'appui psychologique, technique et financier est inconditionnel. Merci aussi à mes amis pour leur soutien, et tout particulièrement à mon père et à Alex pour leurs compétences en informatique.

Finalement, un merci tout spécial à mon fiancé Philippe pour son ordinateur portable, ses encouragements, son courage et sa vaillance qui m'inspirent, mais avant tout pour son amour et pour tout le bonheur que j'ai de vivre en sa compagnie.

*À tous ceux qui relèvent des défis personnels,
Bon courage, le résultat en vaut la peine*

1- INTRODUCTION

L'encéphalite est une maladie inflammatoire du cerveau dont les causes sont nombreuses, incluant les infections par différents types de virus. Les voies par lesquels les virus s'introduisent dans le cerveau et y persistent en causant des dommages cellulaires ne sont pas clairement élucidées. Le modèle animal de l'infection induite par les virus d'hépatite murine (MHV) nous a permis d'étudier les mécanismes par lesquels ces virus pouvaient pénétrer dans le système nerveux central (SNC) et provoquer des encéphalites et des désordres dans la réponse immunitaire antivirale. Nous nous sommes principalement intéressés à la perméabilité des cellules endothéliales formant la barrière hémato-encéphalique à l'infection par des variants des virus MHV ainsi qu'aux effets de ces virus sur les propriétés inflammatoires de ces cellules. Nous avons également étudié les effets de l'infection par ces virus sur les propriétés inflammatoires et les capacités immunomodulatrices des macrophages myéloïdes, qui sont recrutés dans le SNC lors des infections virales. Tout au long de ce mémoire, nous tenterons de démontrer que les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique sont perméables à l'infection par certains sérotypes des virus MHV et que cette perméabilité ne dépend pas toujours de l'expression du récepteur viral, soit la molécule CEACAM-1a. Nous tenterons également de démontrer que les virus MHV modifient les propriétés inflammatoires des cellules endothéliales cérébrales et des macrophages myéloïdes. Donc, la section revue de littérature permettra de décrire les virus MHV et les immunodéficiences qu'ils induisent, ainsi que d'étudier les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique en mettant l'accent sur leurs rôles dans la modulation de la réponse immunitaire antivirale, incluant le recrutement des macrophages, et leur implication dans la dissémination des virus dans le cerveau. Cette revue de littérature sera suivie par la section matériels et méthodes, qui décrit les techniques utilisées lors des expériences.

La section résultat sera divisée en deux parties. La première partie, qui portera sur les cellules endothéliales cérébrales, démontrera que ces cellules sont perméables aux virus MHV étudiés, en fonction du variant mais aussi de l'allèle du récepteur viral CEACAM-1 exprimé par les cellules. Aussi, nous montrerons que cette perméabilité entraîne des anomalies fonctionnelles dans la production de cytokines

par ces cellules et nous tenterons d'identifier le ou les récepteurs impliqués. La seconde partie démontrera que les variants viraux étudiés influencent les fonctions inflammatoires et la capacité immunomodulatrice des macrophages myéloïdes par des mécanismes dépendants ou indépendants de la présence du CEACAM-1a à la surface cellulaire. Une discussion générale faisant un lien entre les résultats obtenus et les mécanismes par lesquels les virus MHV peuvent infecter ces cellules en présence ou en absence du récepteur CEACAM-1a et en moduler les fonctions inflammatoires terminera ce mémoire.

2- REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1- Le système nerveux central

Le système nerveux central (SNC) comprend l'encéphale, située dans la boîte crânienne, ainsi que la moelle épinière, protégée par la colonne vertébrale. Les cellules qui constituent le SNC peuvent être classées en deux principales catégories : les neurones et les cellules gliales. Les neurones sont responsables de la transmission des messages via les voies nerveuses alors que les cellules gliales servent de cellules de soutien. Les cellules gliales, représentées par les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules de la microglie, jouent toutefois un rôle clef dans le fonctionnement normal du cerveau. Elles sont d'ailleurs 10 fois plus abondantes que les neurones dans le cerveau humain (Temburni et Jacob, 2001).

2.1.1- Les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes

Le rôle des neurones est de communiquer des messages sous forme de signaux électriques entre les diverses régions de l'organisme. Leur morphologie particulière leur permet d'assurer cette fonction. Le noyau et les organelles cellulaires se trouvent dans le corps du neurone, portion centrale de la cellule à laquelle se greffent des prolongements, l'axone et les dendrites. Pour favoriser la propagation rapide de l'influx nerveux le long de l'axone, celui-ci est recouvert d'une gaine composée de myéline, une substance riche en lipides (Temburni et Jacob, 2001).

Les neurones du SNC ne pourraient pas assurer leur fonction adéquatement sans la présence des cellules de soutien, dont font partie les astrocytes et les oligodendrocytes. Les oligodendrocytes sont les cellules responsables de la production de myéline, substance formant la gaine isolante autour des axones des neurones et augmentant la vitesse de propagation du potentiel d'action (Butt, 2006). Ils possèdent des récepteurs cellulaires aux neurotransmetteurs qui influencent le processus de myélinisation des axones. Les astrocytes constituent le type cellulaire le plus abondant au niveau du SNC. Ils sont localisés à proximité des capillaires et autour des neurones. Leurs activités incluent le maintien de la barrière hémato-encéphalique, l'apport aux neurones des nutriments nécessaires à leur métabolisme énergétique et l'élimination de l'excès de neurotransmetteurs dans le milieu extracellulaire (Minagar *et al.*, 2002; Korn *et al.*, 2007).

2.1.2- Les cellules de la microglie

Chez l'humain adulte, les cellules de la microglie constituent environ 10% du nombre total de cellules gliales au niveau du SNC (Stoll et Jander, 1999). Selon leur emplacement géographique dans le cerveau, les cellules de la microglie sont divisées en deux sous-populations : la microglie parenchymateuse (située dans le parenchyme cérébral) et la microglie périvasculaire (localisée à proximité des vaisseaux). Les cellules de la microglie représentent les macrophages spécialisés du SNC. Leur principale fonction est de participer aux réponses immunitaires innée et adaptative (Garden et Moller, 2006). Par leurs caractéristiques, les cellules de la microglie ont la capacité de réagir rapidement à la présence de microorganismes indésirables dans le cerveau (Djukic *et al.*, 2006). Le rôle des cellules de la microglie dans l'immunité sera discuté à la section 2.4.2.2.

2.1.2.1- Ontogénie des cellules de la microglie

La moelle osseuse constitue le lieu au sein duquel se produit l'hématopoïèse. Plusieurs cellules du système immunitaire dont les monocytes et les lymphocytes B y sont générés. Les précurseurs des lymphocytes T sont également produits dans la moelle osseuse, bien que leur maturation ait lieu dans le thymus. Les cellules immunitaires produites dans la moelle osseuse migrent par la suite dans les tissus et acquièrent des fonctions spécifiques. Les cellules de la microglie sont générées de la même façon. Les cellules de la microglie proviennent de cellules dérivées de la moelle osseuse et se différencient dans le cerveau. Chez les rongeurs, des cellules myéloïdes précurseurs de la lignée des monocytes/macrophages peuplent le cerveau durant l'embryogenèse et tôt après la naissance et se différencient pour devenir les cellules de la microglie (Ladeby *et al.*, 2005; Djukic *et al.*, 2006). Il a également été établi que durant le développement post-natal, la microglie périvasculaire se régénère régulièrement à partir de monocytes dérivés de la moelle osseuse (Stoll et Jander, 1999; Ladeby *et al.*, 2005; Djukic *et al.*, 2006). De plus, dans un contexte d'inflammation, les monocytes/macrophages provenant de la moelle osseuse migrent vers le SNC où ils se différencient en cellules de la microglie, tel que démontré chez des rats adultes (Flugel *et al.*, 2001). En effet, cinq jours après l'induction de l'inflammation dans le

cerveau de rats, une infiltration massive de monocytes/macrophages a été observée. Entre un et trois jours plus tard, les monocytes/macrophages ont adopté une forme allongée avec des ramifications typiques des cellules microgliales. Ces cellules ont perduré dans le cerveau pour plus de deux semaines (Flügel *et al.*, 2001).

2.1.2.2- Caractérisation phénotypique des cellules de la microglie

Puisque les cellules de la microglie et les macrophages se développent à partir d'un précurseur commun, ces deux types cellulaires partagent plusieurs propriétés. Les macrophages et les cellules de la microglie partagent l'expression d'un grand nombre de marqueurs, dont les CD11b (Mac-1), CD11c, CD45, CD64, CD68, CR3, B7-2 et CMH-I et II) (Lee *et al.*, 2002). Les cellules de la microglie sont difficiles à isoler, car les marqueurs phénotypiques des cellules de la microglie sont semblables à ceux des autres cellules de la lignée des monocytes/macrophages et ne permettent donc pas de différencier les cellules de la microglie résidentes des macrophages périphériques recrutés dans le SNC. Les cellules de la microglie peuvent être partiellement identifiées par l'utilisation combinée de l'anticorps F4/80 et d'un anticorps dirigé contre le CD11b (Rempel *et al.*, 2005). Toutefois, le CD11b exprimé par les cellules de la microglie dans un contexte cérébral normal est également un marqueur macrophagique et l'anticorps F4/80 se lie à une glycoprotéine de surface retrouvée aussi chez les macrophages (Chen *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). D'autres auteurs considèrent que le principal marqueur permettant de différencier les cellules de la microglie des monocytes/macrophages sanguins est le CD45, qui se trouve plus faiblement exprimé chez les cellules de la microglie. Les macrophages périphériques expriment fortement le CD45 alors que l'expression de cette molécule est d'intensité intermédiaire chez les cellules de la microglie (Couraud, 1994). Le CD45 étant exprimé chez toutes les cellules hématopoïétiques, cette approche comporte également des difficultés. Ainsi, l'identification de marqueurs de surface spécifiques pour les cellules de la microglie représente toujours un défi important.

2.2- La barrière hémato-encéphalique

Le cerveau est un organe particulier qui doit être très finement régulé pour fonctionner correctement. Cela ne serait pas possible s'il était soumis aux variations régulières des composants sanguins. La barrière hémato-encéphalique, qui sépare le sang du parenchyme cérébral, est donc essentielle au maintien de l'homéostasie du cerveau (Hamm *et al.*, 2004).

2.2.1- Structure

La barrière hémato-encéphalique est composée principalement de cellules endothéliales organisées en une monocouche tubulaire. Ces cellules sont soutenues par une membrane basale continue dont la formation est sous leur contrôle via la sécrétion de facteurs de croissance (de Boer et Gaillard, 2006). Des astrocytes et des péricytes viennent s'imbriquer dans cette membrane basale et leur présence augmente la stabilité des vaisseaux (Kramer-Hammerle *et al.*, 2005; de Boer et Gaillard, 2006). Les cellules de la microglie périvasculaire se trouvent également à proximité de la barrière hémato-encéphalique (Fig. 1). Les astrocytes, les péricytes et les cellules de la microglie jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement de la barrière hémato-encéphalique, notamment par la sécrétion de facteurs solubles partiellement responsables de l'acquisition et du maintien des propriétés particulières des cellules endothéliales cérébrales (de Boer et Gaillard, 2006; Verma *et al.*, 2006). Des hormones périphériques (cortisol, adrénaline) ainsi que des cytokines et des chimiokines sécrétées localement par des cellules gliales (astrocytes, cellules de la microglie) et des cellules sanguines (lymphocytes, monocytes) sont aussi impliquées dans la régulation de la barrière hémato-encéphalique (de Boer et Gaillard, 2006).

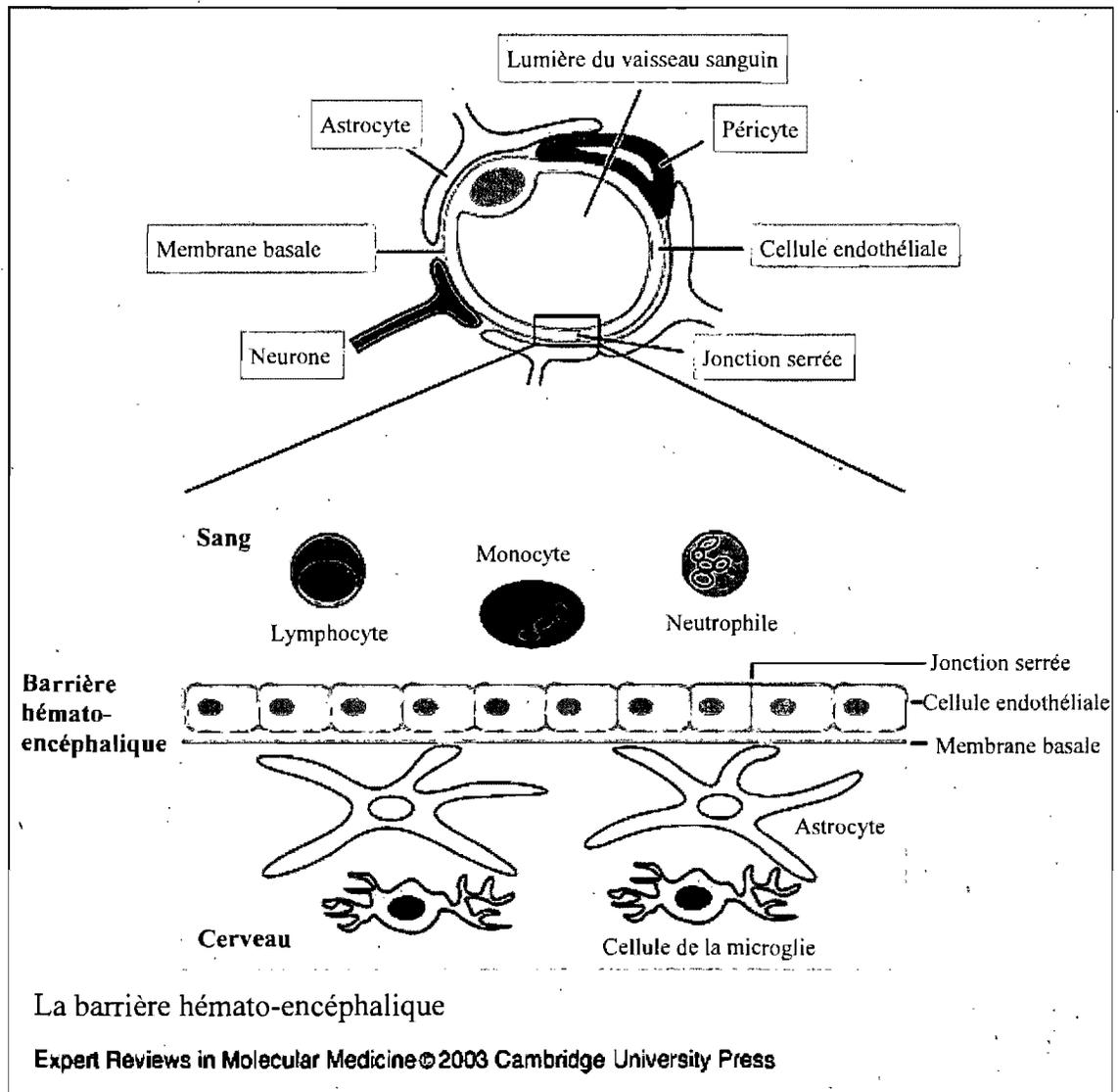


Figure 1. Structure de la barrière hémato-encéphalique.

La barrière hémato-encéphalique est composée de cellules endothéliales soutenues par une membrane basale continue en association avec des astrocytes et des cellules de la microglie. Des leucocytes sanguins, dont des lymphocytes et des monocytes, peuvent aussi influencer les caractéristiques des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique notamment en conditions pathologiques (Francis *et al.*, 2003).

2.2.2- Caractéristiques des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique sont des cellules spécialisées ayant un phénotype particulier et des caractéristiques uniques. Ce sont des cellules polarisées dont le côté luminal fait face à la circulation sanguine et le côté abluminal fait face au parenchyme cérébral (Verma *et al.*, 2006). Comme les cellules endothéliales des autres tissus, elles sont impliquées dans la coagulation sanguine et le

contrôle du tonus vasculaire (de Boer et Gaillard, 2006). Elles forment aussi une barrière solide grâce à la présence de jonctions serrées qui les relient les unes aux autres et, contrairement aux autres types de cellules endothéliales, elles ne sont pas fenestrées (de Boer et Gaillard, 2006). Alors que les molécules du sang traversent généralement l'endothélium par la voie paracellulaire pour pénétrer dans la plupart des organes, l'endothélium cérébral régule plus strictement l'accès au cerveau (Abbott *et al.*, 2006). La barrière hémato-encéphalique bloque la diffusion paracellulaire vers le cerveau des molécules hydrophiles du sang circulant. Elle permet, de cette façon, de maintenir l'homéostasie du milieu chimique extracellulaire du parenchyme cérébral en protégeant le milieu intracérébral des variations biochimiques se produisant dans la circulation sanguine (van Horssen *et al.*, 2005). Les jonctions serrées entre les cellules endothéliales cérébrales permettent de restreindre jusqu'au mouvement de petits ions, tels les ions sodium (Na^+) et chlore (Cl^-), ce qui confère à l'endothélium cérébral une résistance électrique transendothéliale plus de 50 fois supérieure à celle des capillaires de la périphérie (Abbott *et al.*, 2006). Les petites molécules lipophiles de même que les petites molécules gazeuses comme le gaz carbonique (CO_2) et le dioxygène (O_2) ont la capacité de diffuser librement au travers des membranes lipidiques des cellules. Le contrôle de cette diffusion par les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique se fait à l'aide d'un système de transporteurs sélectifs situés des côtés luminal et abluminal des cellules qui permettent le passage de certains composés, par exemple des nutriments, alors qu'ils rejettent les substances indésirables (Abbott *et al.*, 2006). La P-glycoprotéine-p (P-gp) est un exemple de transporteur actif qui contrôle l'acheminement des nutriments ainsi que d'autres molécules, comme les médicaments, dans et hors du cerveau (de Boer et Gaillard, 2006). L'énergie nécessaire au fonctionnement de la P-gp et des autres transporteurs actifs des cellules endothéliales cérébrales est fournie par les mitochondries, qui sont en nombre élevé chez ces cellules en comparaison avec les autres cellules endothéliales de l'organisme (de Boer et Gaillard, 2006). Les plus grosses molécules lipophiles ne passent généralement l'endothélium que par transcytose spécifique médiée par des récepteurs (c'est le cas notamment pour l'insuline et la transferrine) ou de manière non-spécifique par pinocytose. La traversée non-spécifique des molécules lipophiles à travers la barrière

hémato-encéphalique est toutefois restreinte grâce à la faible activité de pinocytose des cellules endothéliales, qui limite le passage transcellulaire de ces substances (Hamm *et al.*, 2004). La barrière hémato-encéphalique joue également un rôle crucial dans la protection du SNC contre les infections virales. En effet, la majorité des virus neurotropes (à l'exception de l'herpes simplex ou du virus de la rage), passent par le sang pour accéder au SNC. Pour ces virus, la barrière hémato-encéphalique constitue la première étape à franchir avant d'atteindre le cerveau (Li *et al.*, 2004). Les fonctions des cellules endothéliales dans la réponse immunitaire sera discuté à la section 2.4.2.3.

2.2.2.1- Origine et ontogénie des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales des différentes régions de l'organisme partagent plusieurs caractéristiques fonctionnelles et morphologiques, mais elles constituent tout de même une classe de cellules très hétérogène. Au sein d'un organe, les cellules endothéliales acquièrent des caractéristiques spécifiques essentielles au maintien de l'homéostasie de cet organe. Cette spécialisation des cellules endothéliales s'acquiert durant le développement pré-natal. Les cellules endothéliales dérivent d'un précurseur commun appelé angioblaste, dont la différenciation à l'intérieur d'un organe est orientée par la composition du milieu local ainsi que par les cellules environnantes. Ces dernières interagissent avec les cellules endothéliales soit par contact cellulaire direct, ou indirectement, via la sécrétion de cytokines et d'autres facteurs solubles et par la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire auxquelles les cellules endothéliales adhèrent pour former les vaisseaux (Garlanda et Dejana, 1997). Au niveau du cerveau, le développement et la spécialisation des vaisseaux se produit aussi durant l'embryogenèse. Les vaisseaux cérébraux se développent en deux étapes principales : la vasculogénèse et l'angiogénèse (Fee *et al.*, 2000). Lors de la vasculogénèse, les cellules endothéliales se différencient, croissent et s'assemblent en un réseau primitif de vaisseaux. La maturation de ce réseau se produit lors de la phase d'angiogénèse. Ce processus implique le remodelage des structures formées et le recrutement de cellules de soutien, dont les cellules musculaires lisses (Fee *et al.*, 2000). Le développement vasculaire est contrôlé par des facteurs de croissance dont les principaux sont le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) et les

angiopoïétines. Plusieurs cytokines influencent également la vascularisation, dont l'IL-6 (Fee *et al.*, 2000). Au niveau du cerveau, cette maturation des vaisseaux conduit à l'acquisition des caractéristiques propres à cet organe. Par exemple, chez les rongeurs, la fenestration des cellules endothéliales cérébrales disparaît chez l'embryon aux jours 11 à 13 alors qu'apparaissent les jonctions serrées (Wolburg et Lippoldt, 2002). Les caractéristiques des cellules endothéliales cérébrales (jonctions serrées complexes, faible nombre de vésicules, systèmes de transport spécialisés, etc.) sont induites par l'environnement local du cerveau, dont la présence des neurones et des astrocytes (Risau *et al.*, 1998). Les vaisseaux cérébraux peuvent continuer à se développer après la naissance. L'angiogénèse est stimulée notamment suite à des dommages au cerveau. Ce processus physiologique permet la réparation des zones endommagées. Des conditions pathologiques peuvent aussi entraîner la formation de vaisseaux cérébraux (Fee *et al.*, 2000).

2.2.2.2- Caractérisation phénotypique des cellules endothéliales

L'étude des propriétés des cellules endothéliales cérébrales est grandement facilitée lorsque ces cellules peuvent être identifiées par des marqueurs de surface. Par contre, les cellules endothéliales constituent une population de cellules assez hétérogène pour laquelle il est difficile d'obtenir un marqueur à la fois spécifique et efficace (Mattsson *et al.*, 2002). Mattsson et ses collaborateurs (2002) ont analysé la présence de plusieurs marqueurs à la surface de cellules endothéliales en provenance de microvaisseaux de différents tissus chez la souris C57BL/6. La fixation de la lectine de *Bandeira simplicifolia* s'est avérée être l'outil le plus sélectif et constant pour l'identification des cellules endothéliales cérébrales. D'autres outils testés pour la détection de marqueurs phénotypiques, tels que les anticorps contre le CD34, le CD31 (PECAM-1), le CD200, le Ox43, le facteur von Willebrand et la lectine *Ulex europaeus*, ont donné des résultats moins intéressants car leur fixation aux cellules endothéliales cérébrales était moins constante (Mattsson *et al.*, 2002). En plus du défi que représente l'identification des cellules endothéliales cérébrales par des marqueurs phénotypiques spécifiques, l'étude de ces cellules est limitée par la difficulté à les

conserver en culture. En effet, les cellules endothéliales cérébrales en culture perdent graduellement leurs caractéristiques spécifiques (Garlanda et Dejana, 1997).

2.3- Les encéphalites virales humaines

Malgré la présence de la barrière hémato-encéphalique, plusieurs virus peuvent s'introduire dans le SNC et provoquer des encéphalites chez l'humain.

2.3.1- L'encéphalite herpétique

Parmi ces virus, le virus herpes simplex (HSV), un membre de la famille des *herpesviridae*, a été identifié comme la première cause de mortalité par encéphalite sporadique aux États-Unis. Qui plus est, le tiers des cas répertoriés d'encéphalite virale par le virus HSV affectaient les enfants et les adolescents (Whitley, 2006). Deux types de HSV ont été identifiés, soient les HSV-1 et HSV-2, mais environ 95% des cas d'encéphalites par HSV sont attribuables au HSV-1 (Skoldenberg, 1996). Par ses propriétés cytolitiques, le HSV cause des dommages à plusieurs types cellulaires au niveau du SNC, dont les neurones, les oligodendrocytes et les astrocytes. Par ailleurs, la réponse immunitaire cellulaire et humorale destinée à éliminer le virus est aussi mise en cause dans les désordres associés à l'infection par HSV (Skoldenberg, 1996). Un traitement à l'acyclovir permet de réduire la mortalité et la morbidité dues à l'encéphalite par le HSV, à condition qu'il soit administré tôt après le début de l'infection, d'où la nécessité d'un diagnostic rapide et adéquat (Tyler, 2004).

2.3.2- L'encéphalite par le virus de la rougeole

Le virus de la rougeole fait partie de la famille des *paramyxoviridae*, caractérisé par un génome composé d'ARN de polarité négative et dont la réplication a lieu dans le cytoplasme des cellules infectées. Ce virus engendre une infection aiguë des voies respiratoires supérieures suite à laquelle le virus est rapidement transporté vers les ganglions lymphatiques. Le virus de la rougeole peut alors causer une infection systémique et se propager dans plusieurs organes où il se réplique essentiellement dans les cellules épithéliales, les monocytes/macrophages et les cellules endothéliales (Andres *et al.*, 2003). L'infection des cellules endothéliales de la barrière hémato-

encéphalique pourrait constituer une voie d'entrée du virus dans le cerveau. En effet, dans la plupart des cas de rougeole, le virus arrive à pénétrer dans le SNC. Toutefois, la présence du virus au niveau du cerveau demeure généralement silencieuse (Carsillo *et al.*, 2006). Dans les cas où des complications surviennent, elles se manifestent sous la forme d'une encéphalite avec des corps d'inclusion ou d'une infection aiguë fulminante des neurones. Chez des patients immunosupprimés, ces complications peuvent même survenir suite à la vaccination préventive avec un vaccin vivant atténué (Carsillo *et al.*, 2006). Une autre complication neurologique de l'infection par le virus de la rougeole peut se produire plusieurs années après la résorption apparente de l'infection, sous la forme d'une panencéphalite subaiguë sclérosante (SSPE). Cette pathologie est le résultat d'une infection persistante des neurones et des cellules gliales du SNC par le virus de la rougeole (Carsillo *et al.*, 2006). Il a été démontré que les cellules endothéliales cérébrales sont également infectées chez les patients souffrants de la SSPE (Andres *et al.*, 2003).

2.3.3- Les encéphalites lors du SIDA

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est un virus du genre lentivirus, de la famille des *retroviridae*, dont le génome d'ARN simple brin est rétro transcrit en ADN avant d'être intégré dans le matériel génétique de la cellule hôte (Kramer-Hammerle *et al.*, 2005). Il est responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), pour lequel il n'existe actuellement aucun traitement curatif. Chez environ la moitié des patients atteints du SIDA, des complications neurologiques surviennent (Benveniste et Benos, 1995). Ces désordres peuvent se manifester sous forme de problèmes de motricité, d'une perte graduelle des capacités cognitives et d'une modification du comportement. Dans les cas les plus graves, on parle de démence associée au VIH (Penkowa *et al.*, 2003; Kramer-Hammerle *et al.*, 2005). Ces troubles neurologiques sont dus à l'infection du SNC par le VIH.

Le virus utilise essentiellement trois mécanismes pour traverser la barrière hémato-encéphalique afin de se rendre dans le SNC. Il peut traverser la barrière sous forme de particules virales libres en passant entre les cellules endothéliales ou au travers de celles-ci dans des vacuoles de transcytose (Banks *et al.*, 2004). D'autre part,

en infectant les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique, le VIH peut être produit et relargué des côtés luminal et abluminal des cellules, c'est-à-dire dans le sang et dans le cerveau (Kramer-Hammerle *et al.*, 2005). Le troisième mode d'entrée du VIH dans le SNC est appelé cheval de Troie parce que le virus est introduit dans le cerveau à l'intérieur de monocytes ou de lymphocytes infectés. Il est proposé que ce troisième mécanisme soit celui privilégié par le VIH pour traverser la barrière hémato-encéphalique, puisque'il a été démontré que les monocytes et les lymphocytes circulent entre le sang et le SNC et que ce sont d'importantes cellules-cibles de l'infection par le VIH (Kramer-Hammerle *et al.*, 2005).

Alors que les désordres neurologiques associés à la présence du VIH dans le cerveau ne surviennent que lorsque le patient atteint la phase SIDA (moins de 200 lymphocytes T CD4+ par μl de sang), le virus lui-même est déjà présent dans le cerveau depuis longtemps. En effet, le VIH entre dans le cerveau tôt après l'infection systémique, mais sa réplication semble être bien contrôlée avant la phase SIDA de la maladie (Kramer-Hammerle *et al.*, 2005). Lorsque le contrôle de la réplication du VIH dans le cerveau est perdu, le virus est produit principalement par les macrophages et les cellules de la microglie (Kramer-Hammerle *et al.*, 2005).

Les neurones ne sont pas une source de production de virions puisqu'ils ne sont pas directement infectés par le VIH. Toutefois, l'apparition des désordres neurologiques chez les patients est la conséquence d'une perte de neurones (Benveniste et Benos, 1995). Plusieurs hypothèses sont à l'étude afin d'expliquer cette perte de neurones. Une production exagérée de cytokines par les cellules de la microglie et les cellules gliales provoquée par leur infection pourrait entraîner la mort des neurones. Des produits viraux comme les protéines Tat et la gp120 pourraient aussi avoir une certaine neurotoxicité lorsque présents en trop grande quantité. Le mauvais fonctionnement et éventuellement la mort des neurones pourraient aussi être causés par l'altération des astrocytes, qui sont d'importantes cellules de soutien pour les neurones (Benveniste et Benos, 1995).

2.4- La réponse immunitaire dans le SNC

Les encéphalites virales humaines sont en émergence à l'échelle planétaire et le développement de stratégies thérapeutiques efficaces nécessite la compréhension des mécanismes complexes de la réponse immunitaire au niveau du SNC (Rempel *et al.*, 2005). L'étude de la réponse immunitaire antivirale dans le SNC est grandement facilitée par l'utilisation de modèles viraux animaux induisant des pathologies inflammatoires dans le SNC (Li *et al.*, 2004).

2.4.1- Le concept de tolérance immunologique en condition normale

L'étude du système immunitaire chez les mammifères et de son interaction avec le SNC est un sujet très complexe. Le SNC doit être régulé de manière à ce qu'un équilibre soit maintenu entre l'élimination par la réponse immunitaire des agents pathogènes qui réussissent à s'y introduire et la protection des cellules contre les dommages reliés à cette même réponse immunitaire. Le SNC a longtemps été considéré comme un site immunologiquement privilégié et, bien que ce concept ait évolué avec les années, le SNC demeure tout de même reconnu comme étant un site de tolérance immunitaire soutenu par plusieurs mécanismes.

Par exemple, la barrière hémato-encéphalique crée un blocage physique entre le sang et le cerveau, réduisant ainsi l'influx non-sélectif des cellules immunitaires à l'intérieur du SNC (Danese *et al.*, 2007). Pour pénétrer dans un tissu, les leucocytes circulants du sang doivent d'abord adhérer à l'endothélium vasculaire, puis migrer entre les cellules endothéliales (Couraud, 1994). Au sein de la microvasculature des organes autres que le cerveau, les leucocytes adhèrent aux cellules endothéliales en conditions normales via des interactions transitoires entre les sélectines exprimées sur l'endothélium et leurs ligands (carbohydrates et glycoprotéines) qui sont constitutivement présents à la surface des leucocytes. Cette adhérence est renforcée dans un contexte inflammatoire par l'interaction entre les intégrines (exprimées sur les leucocytes) et les protéines de la superfamille des immunoglobulines (ICAM-1, VCAM-1, PECAM, etc.) exprimées sur l'endothélium en réponse à des cytokines. Chez les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique, une faible expression des molécules d'adhésion entraîne une adhésion beaucoup plus limitée des

leucocytes que celle observée chez les autres organes, ce qui, conjointement avec la présence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales, explique le nombre extrêmement restreint de cellules immunitaires qui patrouillent le SNC (Couraud, 1994).

La tolérance immunitaire du SNC est aussi renforcée par les faibles niveaux d'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) -I et -II dans le cerveau (Couraud, 1994). Même les cellules de la microglie, qui jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire au niveau du SNC, sont normalement dans un état quiescent caractérisé par une faible expression des molécules des CMH -I et -II et des molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CD40 (Ponomarev *et al.*, 2005). Or, la stimulation des lymphocytes T CD8⁺ ou CD4⁺ nécessite la présentation d'antigènes peptidiques par les molécules du CMH-I ou du CMH-II respectivement et l'engagement des molécules de co-stimulation. La stimulation des lymphocytes est donc restreinte au sein du SNC.

Des cytokines suppressives produites localement sont aussi responsables du maintien de la tolérance immunologique dans le SNC. Dans un SNC sain, le facteur de croissance transformant- β (TGF- β) est produit de manière constitutive (Hickey, 2001). Cette cytokine suppressive produite par les neurones et les cellules gliales, mais surtout par les cellules de la microglie, est importante dans le maintien de l'intégrité du SNC (Gehrmann *et al.*, 1995; Hickey, 2001). En effet, le TGF- β inhibe la prolifération des lymphocytes T qui s'introduisent dans le SNC et régule à la baisse la production de chimiokines par les astrocytes. Le TGF- β agit aussi sur les cellules de la microglie via une boucle autocrine et contribue à leur inactivation (Gehrmann *et al.*, 1995; Hickey, 2001). Le fonctionnement de la barrière hémato-encéphalique est également influencé par la présence du TGF- β , dont l'action sur les cellules endothéliales entraîne une diminution de l'expression des molécules d'adhésion cellulaire, résultant en une réduction de la migration des leucocytes vers le SNC (Fabry *et al.*, 1995). L'IL-10 est aussi une cytokine suppressive constitutivement exprimée par les neurones, les cellules gliales ainsi que les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (Vitkovic *et al.*, 2001; Verma *et al.*, 2006). L'IL-10 possède une activité anti-inflammatoire produisant des effets similaires à ceux du TGF- β , contribuant à la protection des

neurones et au maintien de l'homéostasie dans le SNC (Vitkovic *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002).

Dans d'autres sites où se trouve un état de tolérance immunologique, comme les yeux ou les testicules, l'expression constitutive du ligand de Fas (Fas-L) représente aussi un moyen de limiter la réponse immunitaire. En effet, l'interaction de la molécule Fas à la surface d'une cellule avec son ligand Fas-L induit un signal d'apoptose chez cette cellule. Des études ont démontré une expression constitutive de Fas-L sur les cellules de la microglie dans le SNC (Frigerio *et al.*, 2000). Cette expression constitutive de Fas-L, quoique faible, pourrait aussi constituer un mécanisme par lequel l'état de tolérance immunitaire est maintenu dans le SNC, en favorisant notamment l'apoptose des lymphocytes T qui s'y infiltrent (Frigerio *et al.*, 2000).

Malgré tous ces mécanismes de tolérance immunologique, le SNC doit tout de même posséder des mécanismes de protection contre les virus et autres agents infectieux. Cette protection dépend directement de la capacité des cellules résidentes à établir une réponse innée adéquate, du recrutement des cellules immunitaires au site de l'infection ainsi que de l'établissement d'une réponse immunitaire adaptative (Rempel *et al.*, 2005).

2.4.2- Les cellules participant à la réponse immunitaire dans le SNC et au niveau de la barrière hémato-encéphalique

2.4.2.1- Les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes

Les neurones participent peu à la réponse immunitaire dans le SNC. Ils expriment toutefois des récepteurs cellulaires qui reconnaissent des motifs particuliers chez les pathogènes (PRR) ainsi que des récepteurs au complément (impliqués dans la réponse immunitaire innée) et ils peuvent produire un répertoire limité de cytokines dont le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) (Nataf *et al.*, 1999).

Au contraire, les astrocytes jouent un rôle important dans la réponse immunitaire au niveau du SNC. Ils expriment des PRR dont des récepteurs toll (TLR), des récepteurs au mannose et une série d'autres récepteurs impliqués dans la réponse immunitaire innée. Une fois activés, ils sécrètent une variété de cytokines et de

chimiokines influençant à la fois les réponses immunitaires innée et adaptative. Les astrocytes seraient aussi capables de présenter des antigènes aux lymphocytes T (Minagar *et al.*, 2002; Kramer-Hammerle *et al.*, 2005). L'aptitude des astrocytes à présenter des antigènes aux lymphocytes T demeure toutefois controversée (Korn *et al.*, 2007).

Les oligodendrocytes semblent jouer un rôle restreint dans l'immunité. Par exemple, ils n'expriment pas normalement les molécules du CMH. Ils possèdent toutefois des récepteurs pour plusieurs cytokines et il a été démontré que les oligodendrocytes répondent à certaines de ces cytokines par l'augmentation de l'expression des molécules du CMH-I (Popko et Baerwald, 1999; Cannella et Raine, 2004). Comme les autres cellules gliales et les neurones, ils expriment aussi des PRR et peuvent sécréter du TNF- α (Tang *et al.*, 2007).

2.4.2.2- Les cellules de la microglie

Puisque les cellules de la microglie constituent la population macrophagique résidente du SNC, elles participent activement à la réponse immunitaire (Garden et Moller, 2006). Tout comme les populations macrophagiques du reste de l'organisme avec qui elles partagent plusieurs caractéristiques fonctionnelles, les cellules de la microglie sont très impliquées dans la réponse immunitaire innée grâce à l'expression de PRR qui reconnaissent des motifs particuliers chez les pathogènes (Becher *et al.*, 2000). De plus, comme les macrophages, les cellules de la microglie sont habilitées à faire de la phagocytose et à présenter des antigènes aux lymphocytes T afin d'engendrer une réponse immunitaire adaptative. Les caractéristiques communes entre les macrophages et les cellules de la microglie incluent également la production d'oxyde nitrique (NO) et de cytokines (Stoll et Jander, 1999; Djukic *et al.*, 2006). Les cellules de la microglie étant normalement dans un état quiescent, elles doivent être activées pour participer à la réponse immunitaire. L'activation des cellules de la microglie (par exemple suite à la reconnaissance d'un pathogène via les PRR) entraîne une augmentation de l'expression des molécules du CMH-II et des molécules de co-stimulation ainsi que la sécrétion d'une variété de produits dont des cytokines (les principales étant l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-6) (la fonction des cytokines sera traitée à la

section 2.6), des chimiokines, du NO, mais aussi des protéases et des radicaux libres (Gehrmann *et al.*, 1995; Ontiveros *et al.*, ; Ladeby *et al.*, 2005). Les cellules microgliales activées changent également de morphologie, passant de leur forme ramifiée caractéristique à une morphologie macrophagique typique (Ponomarev *et al.*, 2005). Par contre, lorsqu'elles sont activées de manière chronique, les cellules de la microglie peuvent plutôt contribuer à causer des dommages tissulaires (Djukic *et al.*, 2006).

2.4.2.3- Les cellules endothéliales cérébrales

En plus de leur rôle dans les échanges de molécules entre le sang et le cerveau, les cellules endothéliales sont également impliquées dans l'immunité. La faible perméabilité de la barrière s'accroît lors de pathologies telles que des tumeurs cérébrales ou des inflammations (méningite, sclérose en plaque, encéphalites, etc.), ce qui favorise le passage de molécules et de cellules du système immunitaire (monocytes/macrophages et lymphocytes) provenant du sang (de Boer et Gaillard, 2006). Simultanément avec l'accroissement de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, l'activation des cellules endothéliales cérébrales entraîne une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion (ICAM-1 et VCAM-1) et, par conséquent, une adhésion accrue des leucocytes et une augmentation de leur entrée dans le SNC. Les conséquences d'une perméabilité accrue de la barrière hémato-encéphalique peuvent être bénéfiques ou néfastes dépendamment du contexte et de la maladie.

En plus de permettre l'entrée des cellules du système immunitaire dans le SNC, les cellules endothéliales cérébrales jouent un rôle direct dans l'immunité innée par l'expression de récepteurs PRR, dont plusieurs TLR incluant le TLR2 et le TLR4 (Verma *et al.*, 2006).

Les cellules endothéliales cérébrales participent à la réponse immunitaire en sécrétant des cytokines et des chimiokines, en y répondant et en les transportant au travers de la barrière hémato-encéphalique grâce à la présence de transporteurs spécifiques (Verma *et al.*, 2006). Toutefois, il y a encore très peu de littérature au sujet des cytokines et autres molécules sécrétées par les cellules endothéliales cérébrales

(Quan et Banks, 2007). Ainsi, la participation directe des cellules endothéliales à la réponse immunitaire via la sécrétion de cytokines en réponse à la présence d'autres cytokines ou suite à leur infection par des virus demeure peu connue. Il a tout de même été démontré que les cellules endothéliales ont la capacité de produire du NO, des prostaglandines (dont la PGE₂) ainsi que des cytokines et des chimiokines (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TGF- β , TNF- α) (Quan et Banks, 2007).

2.4.2.4- Les monocytes / macrophages et les lymphocytes

Puisque les modifications de la barrière hémato-encéphalique entraînent un recrutement accru de leucocytes (monocytes/macrophages et lymphocytes) à l'intérieur du SNC, ces cellules sont très importantes dans la réponse immunitaire dans le SNC et leur participation influence le cours de la maladie (Couraud, 1994). Les leucocytes infiltrants fournissent un apport considérable de cytokines et de chimiokines dans le SNC. La réponse immunitaire produite par ces cellules est protectrice dans plusieurs types d'infections du SNC. Par exemple, les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques sont importants pour l'élimination des coronavirus murins MHV du SNC (Rempel *et al.*, 2004). Par contre, les cellules infiltrantes peuvent aussi engendrer une réponse immunitaire inappropriée ayant pour conséquence d'amplifier la pathologie, comme c'est le cas lorsqu'une réponse immunitaire antivirale dans le cerveau entraîne l'activation de lymphocytes T auto-réactifs qui provoquent une maladie auto-immunitaire (Rempel *et al.*, 2004).

2.5- Nature des récepteurs de la surface des cellules du SNC impliqués dans la production de cytokines inflammatoires

Puisque les cellules gliales, les cellules endothéliales cérébrales et les neurones expriment des PRR, la détection des pathogènes par ces cellules via leurs PRR constitue l'un des mécanismes utilisés par le système immunitaire inné pour initier une réponse dirigée contre ces pathogènes.

2.5.1- Les récepteurs Toll (TLR)

Les TLR sont des molécules transmembranaires formant des homo- ou des hétéro-dimères afin de reconnaître des motifs moléculaires spécifiques des composants microbiens (PAMPs). Les TLR reconnaissent aussi une gamme de molécules de l'hôte libérées lors de dommages tissulaires. Suite à la reconnaissance de leur ligand, les TLR envoient des signaux cellulaires permettant l'initiation des réponses immunitaires innée et adaptative par la sécrétion de cytokines, d'enzymes et d'autres molécules pro-inflammatoires (Herrmann *et al.*, 2006; Konat *et al.*, 2006). Chez la souris, 13 TLR ont été identifiés, et une dizaine ont été répertoriés jusqu'à maintenant chez l'humain (Konat *et al.*, 2006). Certains TLR (dont les TLR 3, 7, 8 et 9) sont localisés à l'intérieur des cellules au niveau des endosomes où ils sont le plus susceptibles de rencontrer les pathogènes intracellulaires, alors que les autres sont localisés à la surface cellulaire (Herbst-Kralovetz et Pyles, 2006). Les TLR ont une structure composée d'un domaine extracellulaire riche en leucine (LRR) et d'une région intracellulaire hautement conservée appelée le récepteur Toll/interleukine-1 (TIR) (Konat *et al.*, 2006). La signalisation intracellulaire induite par la fixation du ligand sur le TLR passe par l'association du domaine cytoplasmique TIR avec la protéine adaptatrice MyD88 (excepté pour les TLR 3 et 4, qui signalent via une voie indépendante de MyD88) (Wetzler, 2003; Konat *et al.*, 2006). Le complexe ainsi formé recrute la kinase IRAK (IL-1 receptor associated kinase) qui s'autophosphoryle et s'associe au facteur TRAF6 (TNF-receptor-associated factor 6). Cette cascade induit l'activation du facteur de transcription NF- κ B et des kinases MAP (MAPK) qui activent un autre facteur de transcription appelé AP-1. Le NF- κ B et l'AP-1 ainsi activés augmentent la transcription de divers gènes associés à la production de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines, d'enzymes et d'autres molécules impliquées dans l'élimination des microorganismes pathogènes (Takeda et Akira, 2004b; Konat *et al.*, 2006).

Le TLR2 est classé dans la famille des TLR1 (avec les TLR 1, 6 et 10). Il forme des homodimères ou des hétérodimères avec le TLR1 ou le TLR6 (Wetzler, 2003). Le TLR2 est exprimé par les cellules immunitaires incluant les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes B et T et les cellules NK (Matsuguchi *et al.*, 2000; Meng *et al.*, 2005). Au niveau du SNC, le TLR2 est exprimé à la surface des

astrocytes et des cellules de la microglie ainsi que chez les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique, mais son expression n'a pas été détectée chez les neurones (Bermopohl *et al.*, 2005; Neher et Brown, 2007). Les ligands les plus connus de la famille des TLR1 sont les lipoprotéines d'origine bactérienne (Konat *et al.*, 2006). Le TLR2 reconnaît également certaines protéines de choc thermique (HSP) de l'hôte, soient les HSP -60 et -70 (Takeda et Akira, 2004a; Konat *et al.*, 2006). De plus, d'après certaines études récentes, le TLR2 jouerait aussi un rôle dans la reconnaissance virale. Des études portant sur le virus HSV-1 ont mis en évidence l'interaction des glycoprotéines virales avec les homodimères TLR2/2 de même que les hétérodimères TLR2/1 et TLR2/6 (Herbst-Kralovetz et Pyles, 2006). Il a également été démontré, à l'aide de cellules rénales d'embryons humains HEK293 exprimant ou non le TLR2, que le HSV-1 induisait la production de cytokines inflammatoires et de chimiokines, telles que l'IL-6 et le MCP-1, via son interaction avec le TLR2 (Kurt-Jones *et al.*, 2004). L'interaction de plusieurs autres virus dont le cytomégalovirus (CMV), le virus Epstein Barr (EBV), le virus de la rougeole et le virus de l'hépatite C (HCV) avec le TLR2 a également été établie (Bieback *et al.*, 2002; Compton *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2007; Gaudreault *et al.*, 2007). Aucune étude portant sur la fixation des coronavirus MHV au TLR2 n'a toutefois été réalisée.

2.5.2- Les régions riches en héparane sulfate

Outre les TLR, d'autres molécules de la surface cellulaire peuvent fixer certains virus, ce qui est le cas de l'héparane sulfate. L'héparane sulfate est une glycosaminoglycane qui se retrouve sous sa forme protéoglycane à la surface des cellules et dans la matrice extracellulaire de tous les organes et tissus des mammifères (Stringer et Gallagher, 1997). Les glycosaminoglycanes ont des rôles biologiques très variés. Elles sont impliquées dans l'adhésion et la migration cellulaire, la résilience du cartilage, le contrôle de la fibrinogénèse et la signalisation cellulaire (Ruoslahti, 1989). L'héparane sulfate protéoglycane (HSPG) est constituée de deux à trois chaînes polysaccharidiques reliées à un polypeptide par ses résidus sérine (Stringer et Gallagher, 1997). Il a été récemment montré que plusieurs virus, dont le HSV, le VIH, les virus des hépatites B et C et certains coronavirus (dont le virus de la bronchite

infectieuse aviaire et le MHV) pouvaient se fixer à l'HSPG (Barth *et al.*, 2003; Banks *et al.*, 2004; de Haan *et al.*, 2005; Madu *et al.*, 2007; Schulze *et al.*, 2007). La liaison d'un virus à ce récepteur pourrait lui permettre un rapprochement avec ses récepteurs cellulaires spécifiques. Dans certains cas, l'HSPG peut aussi jouer directement le rôle d'un récepteur viral et médier l'entrée du virus dans la cellule. C'est le cas notamment pour certains variants du coronavirus MHV-A59 dont la glycoprotéine S présentait certaines mutations particulières. Il est connu que l'attachement et l'entrée des coronavirus MHV dans une cellule dépend principalement de la présence de la molécule d'adhésion cellulaire de l'antigène carcino-embryonnaire (CEACAM)-1a à la surface de la cellule, ce qui confère aux virus MHV leur spécificité d'hôte (de Haan *et al.*, 2006). Toutefois, il a été démontré que l'infection persistante de cellules en culture par le virus MHV-A59 pouvait provoquer l'apparition de variants viraux capables d'infecter des cellules non-murines (Schickli *et al.*, 1997; de Haan *et al.*, 2005). Ces mutants du virus MHV-A59 ne dépendaient plus de la présence du CEACAM-1a murin pour infecter les cellules, mais entraient dans les cellules de manière dépendante de l'HSPG (de Haan *et al.*, 2005). Il a alors été suggéré que les mutations permettant aux virus MHV d'utiliser l'HSPG comme récepteur d'entrée dans la cellule pourraient survenir *in vivo* chez des animaux infectés de manière persistante, dans des tissus comme le SNC où le récepteur spécifique est faiblement exprimé.

2.6- Nature et fonctions des cytokines générées durant l'infection virale.

L'interaction d'un microorganisme avec les récepteurs de la surface cellulaire, particulièrement les TLR, engendre généralement la production de cytokines par la cellule. Les cytokines sont des médiateurs importants de la réponse immunitaire au niveau du SNC et de tout l'organisme puisqu'elles constituent un groupe de protéines sécrétées permettant la communication entre les cellules du système immunitaire (Li *et al.*, 2004). Leurs actions peuvent être autocrine, paracrine et parfois systémique. Chaque cytokine peut produire une multitude d'effets biologiques sur plusieurs types cellulaires différents et plusieurs cytokines peuvent aussi agir de façon similaire. Une combinaison de cytokines peut produire un effet synergique alors qu'une combinaison différente aura un effet antagoniste. Une cytokine peut induire la synthèse d'autres

cytokines ou l'inhiber (Benveniste et Benos, 1995; Munoz-Fernandez et Fresno, 1998). Les effets des cytokines sont donc variés et multiples.

Les cytokines sont produites comme moyen de défense en réponse aux attaques des microorganismes pathogènes. Elles sont impliquées non seulement dans les réactions immunitaires, mais aussi dans l'inflammation, le choc septique, l'angiogénèse, l'adhésion cellulaire, l'apoptose et l'inhibition de la réplication virale (Benveniste et Benos, 1995). Elles agissent par liaison à des récepteurs spécifiques à la surface cellulaire. Les récepteurs aux cytokines étant très spécifiques, un effet biologique peut donc être induit par une très faible quantité de cytokines. La liaison d'une cytokine à son récepteur cellulaire provoque l'activation de seconds messagers. Ceux-ci activent des protéines kinases ou phosphatases qui régulent l'activité de facteurs de transcription qui reconnaissent des séquences spécifiques dans les promoteurs d'une variété de gènes, incluant les gènes des cytokines (Benveniste et Benos, 1995). Cette reconnaissance entraîne l'expression ou la répression de ces gènes (Munoz-Fernandez et Fresno, 1998).

Au niveau du SNC, les cellules résidentes de même que les cellules qui s'y infiltrent peuvent produire des cytokines. Une variété de stimuli provoquent la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par les cellules du SNC dont des prostaglandines (PG) et d'autres médiateurs inflammatoires tels que des composants viraux, bactériens ou parasitaires, ainsi que les produits libérés à la suite de dommages tissulaires (Munoz-Fernandez et Fresno, 1998).

2.6.1- Le facteur de nécrose tumorale (TNF- α)

Le TNF- α a été découvert grâce à sa capacité à détruire les cellules tumorales (Carswell *et al.*, 1975). Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire de 17 kDa ayant une activité extrêmement brève puisque cette molécule a une demi-vie très courte (Jones *et al.*, 1989; Aderka *et al.*, 1992).

Les principaux producteurs de TNF- α sont les macrophages (Benveniste et Benos, 1995). Conjointement avec l'IL-1 β , le TNF- α est d'ailleurs la principale cytokine produite par les macrophages périphériques en réponse à des dommages tissulaires ou à une infection (Konsman *et al.*, 2007). D'autres cellules ont également

la capacité de sécréter du TNF- α lorsqu'elles sont activées. Parmi celles-ci se retrouvent des cellules immunitaires (monocytes, lymphocytes B, lymphocytes T) ainsi que des cellules du SNC (cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique, astrocytes, cellules de la microglie, neurones) (Bazzoni et Beutler, 1996; Munoz-Fernandez et Fresno, 1998). Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire qui n'est pas présente dans le SNC sain (Hickey, 2001). Par contre, de nombreux stimuli entraînent l'induction de la production de TNF- α chez les cellules habilitées à le faire. Plusieurs sources de stress au niveau du SNC, dont l'infection virale, entraînent l'activation des cellules résidentes du SNC. Une fois activées, ces cellules produisent plusieurs cytokines inflammatoires incluant le TNF- α . Dans un contexte d'infection, ce sont les astrocytes et les cellules de la microglie qui deviennent les principales sources de TNF- α dans le SNC (Perry *et al.*, 1995).

Suite à sa production, le TNF- α peut lui-même amplifier sa propre production par rétroaction positive. L'IL-1 β et l'IFN- γ induisent également la production de TNF- α chez les astrocytes et les cellules de la microglie (Perry *et al.*, 1995). L'IL-2 est aussi un bon inducteur du TNF- α et elle augmente l'expression des récepteurs au TNF- α à la surface des cellules. Au contraire, les IL-4, -6 et -10 régulent plutôt à la baisse la production du TNF- α (Cavaillon, 1993; Salgado *et al.*, 1994).

Le TNF- α est un bon activateur des macrophages et il stimule la production de plusieurs cytokines chez ces cellules. Ainsi, en présence de TNF- α , les macrophages produisent davantage de PGE₂, des IL-1, -6, -8 et -10 et de TNF- α (Cavaillon, 1993; Salgado *et al.*, 1994). Chez les cellules endothéliales en général, le TNF- α stimule la production de cytokines, de chimiokines et d'autres molécules dont les principales sont les PG, les IL-1, -6 et -8, les protéines chimioattractives de macrophages (MCP-1), le facteur stimulant les colonies de granulocytes/macrophages (GM-CSF), l'endothéline-1 et le NO (Cavaillon, 1993; Salgado *et al.*, 1994). Les effets du TNF- α sur les cellules endothéliales incluent également l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion et de la perméabilité vasculaire (Trickler *et al.*, 2005). Tous ces effets combinés sont responsables du recrutement, de l'adhésion et du passage accrus des cellules sanguines (neutrophiles, monocytes/macrophages et lymphocytes) à travers les

vaisseaux (Munoz-Fernandez et Fresno, 1998). Le TNF- α a aussi un impact sur la barrière hémato-encéphalique, que ce soit lorsque produit localement dans le SNC dans un site d'inflammation localisé ou lorsque présent dans la circulation lors d'une infection systémique (Hickey, 2001). Il a été démontré que les cellules endothéliales cérébrales exprimaient de façon constitutive le récepteur p55 au TNF- α et que son expression pouvait être augmentée en présence d'un stimulus inflammatoire (Matsumura et Kobayashi, 2004). Les effets du TNF- α sur la barrière hémato-encéphalique sont similaires à ceux observés chez les cellules endothéliales du reste de l'organisme. Ainsi, le TNF- α a des effets amplificateurs sur la perméabilité et sur les propriétés d'adhésion de l'endothélium cérébral, ce qui favorise l'adhésion des leucocytes à l'endothélium et leur migration trans-endothéliale (Benveniste et Benos, 1995; Trickler *et al.*, 2005).

Dans le SNC, le TNF- α stimule la production de PGE₂ et d'IL-1 en agissant sur les neurones de l'hypothalamus, ce qui provoque la fièvre. Il a aussi un effet direct sur les oligodendrocytes et les astrocytes (Benveniste et Benos, 1995). Il induit la production de TNF- α (par rétroaction positive) et d'IL-6 par les astrocytes et augmente leur prolifération et l'expression d'ICAM-1 à leur surface (Benveniste et Benos, 1995). L'augmentation de l'expression d'ICAM-1 favorise la liaison des lymphocytes et des monocytes activés aux astrocytes (Benveniste et Benos, 1995).

La présence de TNF- α au niveau du cerveau est aussi associée à de la neurotoxicité (Rempel *et al.*, 2005). La production massive de TNF- α dans le SNC peut devenir dommageable pour les cellules résidentes. En effet, le TNF- α est un inducteur de la synthèse de iNOS, une enzyme impliquée dans la génération de NO. Le NO est un effecteur de la réponse immune à des pathogènes spécifiques, mais il constitue aussi une molécule cytotoxique pour les oligodendrocytes et les neurones (Gehrmann *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 1995). Sun et ses collègues (1995) ont aussi remarqué que les oligodendrocytes en culture étaient sensibles aux effets toxiques du TNF- α produit par les astrocytes, causant des dommages entraînant la mortalité cellulaire.

2.6.2- L'interleukine 6 (IL-6)

L'IL-6 est une glycoprotéine de 26kDa qui peut être produite par une grande variété de cellules activées comme les monocytes, les macrophages, les lymphocytes T et les lymphocytes B (Diehl et Rincon, 2002). Il y a également plusieurs sources cellulaires d'IL-6 dans le SNC. Les cellules de la microglie, les astrocytes, les neurones et les cellules endothéliales cérébrales possèdent la capacité d'en sécréter (Joseph *et al.*, 1993; Fee *et al.*, 2000). Par contre, dans le cerveau de souris adultes saines, Fee et ses collègues n'ont détecté l'ARNm de l'IL-6 dans aucune de ces cellules, suggérant que l'IL-6 n'est produite qu'en réponse à une agression quelconque (Fee *et al.*, 2000). D'autres études ont toutefois démontré que cette cytokine est produite normalement dans le cerveau, mais à un très faible niveau (Van Wagoner et Benveniste, 1999). L'une des sources cellulaires de cette production *in vivo* pourrait être les cellules endothéliales cérébrales, puisque Verma *et al* (2006) ont démontré que les cellules endothéliales cérébrales murines cultivées *in vitro* produisent naturellement une petite quantité d'IL-6, soit de l'ordre de 50 pg/mL du côté abluminal et 550 pg/mL du côté luminal après 24h de culture.

L'IL-6 est induite par une grande variété de stimuli. Les produits bactériens de même que les cytokines inflammatoires, particulièrement l'IL-1 β et le TNF- α , sont de bons inducteurs d'IL-6 (Vanden Berghe *et al.*, 2000; Verma *et al.*, 2006). L'IL-6 est également produite en réponse à une infection virale (Sehgal, 1990). Des blessures ou des maladies inflammatoires du SNC sont souvent associées à des niveaux élevés d'IL-6 dans le cerveau des patients (Van Wagoner et Benveniste, 1999).

Plusieurs cellules lymphoïdes et non-lymphoïdes possèdent la capacité de répondre à l'IL-6 via l'expression des récepteurs spécifiques. C'est le cas notamment des lymphocytes T et B activés, des monocytes/macrophages, des cellules de la microglie, des astrocytes et des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (Matsumura et Kobayashi, 2004). Chez les cellules endothéliales cérébrales, il a toutefois été démontré que les récepteurs à l'IL-6 étaient absents normalement, mais pouvaient être induits en réponse à divers signaux inflammatoires (Matsumura et Kobayashi, 2004).

L'IL-6 agit comme un médiateur humoral de la fièvre en réponse à une infection ou une inflammation via l'induction de la Cox-2, une enzyme impliquée dans la synthèse des PG (Rummel *et al.*, 2006). L'IL-6 induit notamment l'expression de la Cox-2 par les cellules de la microglie, chez lesquelles la production d'IL-1 β et de TNF- α est également induite par l'IL-6 (Kradly *et al.*, 2008). L'IL-6 a aussi pour effet de stimuler la vasculogénèse chez les cellules endothéliales. Lorsque de l'IL-6 est ajoutée au milieu de culture de cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris cultivées *in vitro*, ces cellules prolifèrent de manière dose-dépendante et la formation d'un réseau primitif de tubes vasculaires est accélérée (Fee *et al.*, 2000). L'IL-6 pourrait donc contribuer au processus de guérison suite à des blessures dans le SNC par stimulation de la vasculogénèse (Fee *et al.*, 2000). Plusieurs études ont aussi montré des effets bénéfiques de l'IL-6 sur la survie, la différenciation et la protection des neurones (Van Wagoner et Benveniste, 1999). Ainsi, des niveaux d'IL-6 élevés à l'intérieur du SNC sont considérés comme bénéfiques, mais seulement lorsque leur sur-expression est transitoire. Produite de façon aiguë, l'IL-6 contribue à la neuroprotection, alors que la synthèse chronique de cette cytokine est impliquée dans l'aggravation des maladies inflammatoires du SNC (Rempel *et al.*, 2005). Lorsque l'IL-6 est produite de façon continue sur une longue période, elle semble contribuer à la pathogénèse de plusieurs désordres dont la sclérose en plaques, l'Alzheimer et certains désordres psychiatriques (Fee *et al.*, 2000).

2.6.3- L'interleukine 10 (IL-10)

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire produite par les lymphocytes T CD4+ de type Th2, les cellules T régulatrices de type 1, les lymphocytes B et les macrophages activés ainsi que d'autres cellules non-lymphoïdes comme les kératinocytes (Levings *et al.*, 2002; Hacham *et al.*, 2004). Elle est aussi produite dans le SNC par les neurones, les astrocytes et les cellules de la microglie, et Verma et ses collègues (2006) ont été les premiers à démontrer que les cellules endothéliales cérébrales en sécrètent également. L'IL-10 a une action inhibitrice sur la production de plusieurs cytokines inflammatoires et chimiokines, dont l'IFN- γ , l'IL-2, l'IL-3, l'IL-12, le CSF (colony stimulating factor) et le TNF- α (Fiorentino *et al.*, 1991; Cannella et

Raine, 2004). Outre son effet anti-inflammatoire, d'autres effets ont été attribués à l'IL-10. Cette cytokine possède des propriétés anti-tumorale et anti-apoptotique et elle stimule la prolifération de certains types cellulaires (kératinocytes, lymphocytes T cytotoxiques, lymphocytes B et cellules NK) (Hacham *et al.*, 2004).

L'IL-10 est présente normalement dans le SNC et les astrocytes en sont les principaux producteurs dans le cerveau des sujets sains (Cannella et Raine, 2004). Dans le SNC, le rôle anti-inflammatoire de l'IL-10 contrebalance l'action de l'IL-1 et du TNF- α afin de maintenir l'homéostasie (Vitkovic *et al.*, 2001). L'IL-10, tout comme le TGF- β , est une cytokine connue notamment pour sa capacité à réguler à la baisse l'activation des cellules de la microglie (Gehrmann *et al.*, 1995). Il a d'ailleurs été démontré *in vitro* que le pré-traitement de cellules de la microglie avec l'IL-10 inhibait la production de TNF- α induite par le lipopolysaccharide bactérien (LPS) chez ces cellules (Lee *et al.*, 2002). Puisque l'IL-10 atténue la production de cytokines inflammatoires, elle exerce une fonction suppressive indirecte chez les cellules endothéliales cérébrales. Kang et ses collègues (2008) ont récemment démontré que l'IL-10 virale (encodée par le génome du virus Epstein Barr), qui possède des propriétés anti-inflammatoires similaires à l'IL-10 humaine ou murine, inhibait l'induction des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 chez les cellules endothéliales cérébrales, ce qui diminuait l'adhésion des monocytes à l'endothélium. Leurs résultats suggèrent que l'IL-10 humaine ou murine pourrait induire ce même effet (Kang *et al.*, 2008).

2.6.4- L'interleukine 12 (IL-12)

L'IL-12 est un hétérodimère composé de sous-unités de 40kDa et 35kDa qui sont reliées entre elles par un pont disulfure (Brunda, 1994). Elle est principalement produite par les monocytes/macrophages, et plus faiblement par les lymphocytes B (Brunda, 1994). Les cellules NK et les lymphocytes T sont les principales cibles de l'IL-12. Cette cytokine augmente l'activité cytolytique des cellules NK et participe à l'induction de la réponse des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques en combinaison avec l'IL-2 (Brunda, 1994). L'IL-12 induit la production d'IFN- γ par les cellules NK et les lymphocytes T et elle contribue à stimuler la prolifération de ces cellules en présence

d'autres stimuli activateurs (Chehimi et Trinchieri, 1994). Excepté pour l'IFN- γ , l'IL-12 est une faible activatrice de la production de cytokines (Brunda, 1994). L'IL-12 est toutefois très importante pour la polarisation des lymphocytes T CD4+ de type Th1 (Brunda, 1994). Ainsi, l'IL-12 joue un rôle important dans la défense contre les pathogènes intracellulaires par l'activation indirecte des macrophages via l'induction de la production d'IFN- γ par les lymphocytes T et les cellules NK et par l'amplification de la réponse immunitaire à médiation cellulaire dépendante du développement des lymphocytes T CD4+ de type Th1 (Chehimi et Trinchieri, 1994).

Les monocytes/macrophages produisent de l'IL-12 en réponse aux bactéries ou aux pathogènes intracellulaires (Chehimi et Trinchieri, 1994). L'IFN- γ augmente aussi la production d'IL-12 par les monocytes/macrophages, ce qui crée une boucle de rétroaction positive entre l'IL-12 et l'IFN- γ (Trinchieri *et al.*, 1992). La production d'IL-12 est toutefois régulée négativement par l'IL-4 et l'IL-10 (Trinchieri *et al.*, 1992).

Au niveau de la barrière hémato-encéphalique, aucune production d'IL-12 n'a pu être détectée chez les cellules endothéliales (Verma *et al.*, 2006). Par contre, à l'intérieur du SNC, les cellules de la microglie et les astrocytes peuvent en produire (Becher *et al.*, 2000; Kawanokuchi *et al.*, 2006). La production d'IL-12 par les cellules de la microglie est induite par le contact cellulaire avec des lymphocytes T activés. Il a été démontré que la liaison du CD40 à la surface des cellules de la microglie avec son ligand (CD40L) chez les lymphocytes T activés, en présence de TNF- α (produit par les cellules de la microglie), entraînait l'induction de la production d'IL-12 (Becher *et al.*, 2000). Il a également été démontré que la production d'IL-12 était fortement induite chez les cellules de la microglie suite à l'activation des TLR3, et moins fortement par la liaison avec les TLR2 ou les TLR4 (Jack *et al.*, 2005). Dans le SNC, les cellules de la microglie répondent à l'IL-12 par la production d'IFN- γ , qui induit l'expression des molécules du CMH-II sur les cellules de la microglie. Ainsi, l'IL-12 favorise indirectement l'augmentation des interactions entre les cellules de la microglie et les cellules immunitaires infiltrantes (Kawanokuchi *et al.*, 2006).

2.6.5- La prostaglandine E₂ (PGE₂)

Les PG sont des métabolites synthétisés à partir de l'acide arachidonique par l'action des Cox. Les Cox sont des enzymes cellulaires existant sous deux formes, soient la Cox-1, qui est constitutive et la Cox-2, qui n'est généralement pas exprimée, mais qui est fortement induite chez certains types cellulaires (dont les macrophages, les cellules de la microglie et les cellules endothéliales) en réponse à des cytokines, au LPS et à d'autres signaux inflammatoires (Hull *et al.*, 2006). Le principal produit de l'activité de la Cox-2 est la PGE₂ (Hull *et al.*, 2006).

Les PG participent à la signalisation autocrine et paracrine dans l'ensemble du corps. Ces molécules sont particulièrement importantes dans la régulation de la réponse vasculaire, de l'apoptose et de l'inflammation. Elles sont associées à la fièvre via l'induction de la Cox-2 dans les cellules endothéliales par plusieurs stimuli, dont le LPS bactérien (Rummel *et al.*, 2006).

Dans le cerveau sain, les niveaux de PGE₂ détectés sont extrêmement faibles, voire nuls (Minghetti *et al.*, 1998). La quantité de PGE₂ produite augmente toutefois dans plusieurs maladies inflammatoires du SNC, dont la sclérose en plaques et la démence associée au VIH (Minghetti *et al.*, 1998). Les astrocytes et les cellules de la microglie activées sont des productrices de PGE₂, mais les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique représentent la principale source de PGE₂ au niveau du SNC (Minghetti *et al.*, 1998; Matsumura et Kobayashi, 2004).

La sécrétion de PGE₂ par les cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux peut être induite en réponse au LPS bactérien, à l'IL-1 β , au TGF- β ainsi qu'au TNF- α alors qu'elle est inhibée par l'IL-10 ou l'IFN- γ (Guo *et al.*, 2006). Selon une étude réalisée par Trickler et ses collègues (2005), l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par le TNF- α serait d'ailleurs due à l'augmentation de l'expression de la Cox-2 suivie de la production accrue de PGE₂.

Par contre, la PGE₂ agit comme un inhibiteur de la production de TNF- α (Meja *et al.*, 1997). Il a aussi été démontré que la PGE₂ inhibait la production d'IL-12 par les cellules de la microglie, alors qu'elle stimule leur production d'IL-10 (qui est elle-même inhibitrice de la production d'IL-12) (Levi *et al.*, 1998; Aloisi *et al.*, 1999). La PGE₂ est également partiellement impliquée dans l'inhibition de la prolifération des

lymphocytes T CD4⁺ et de leur production d'IFN- γ dans le SNC en conditions pathologiques (Trajkovic *et al.*, 2004). Il a aussi été démontré que la PGE₂ inhibait l'activité pro-inflammatoire et modulait les propriétés immunologiques des cellules dendritiques, des monocytes et des macrophages (Winnall *et al.*, 2007).

2.6.6- Les interférons (IFN)

La famille des IFN regroupe des cytokines structurellement reliées et possédant une activité antivirale commune (Takaoka et Yanai, 2006). Il y a plusieurs types d'IFNs qui interagissent avec leurs récepteurs respectifs. Les récepteurs aux interférons, bien qu'ils soient spécifiques de type, sont tous structurellement constitués de deux sous-unités hétérologues (Takaoka et Yanai, 2006).

2.6.6.1- Les interférons de type I

L'IFN- α fait partie des IFN de type I, avec l'IFN- β , - ω , - ε et - κ (Takaoka et Yanai, 2006). En plus de l'activité antivirale pour laquelle ils sont reconnus, les IFNs de type I ont deux autres activités biologiques principales : une activité anti tumorale et des fonctions immunomodulatrices (Takaoka et Yanai, 2006). Les IFNs de type I sont massivement produits par la plupart des types cellulaires en réponse à une infection virale et leur rôle est crucial dans la résistance innée contre les virus. Les IFNs de type I induisent, en effet, une multitude d'effets antiviraux directs et indirects (Takaoka et Yanai, 2006). La production d'IFN- α/β par une cellule infectée établit un état de défense antivirale chez les cellules adjacentes (Mogensen et Paludan, 2005). De plus, les IFNs de type I activent des cellules effectrices du système immunitaire innée telles les cellules NK, les macrophages et les cellules dendritiques, et ils participent à la différenciation des monocytes en cellules dendritiques en plus de potentialiser leur maturation (Coccia *et al.*, 2006; Takaoka et Yanai, 2006). En association avec d'autres cytokines, telle l'IL-12, les IFNs- α/β stimulent également le développement d'une réponse immunitaire adaptative nécessaire à l'élimination virale et au développement d'une immunité protectrice (Mogensen et Paludan, 2005). La majorité des cellules murines et humaines, incluant les astrocytes et les cellules de la microglie, peuvent produire des IFNs- α/β *in vitro*. Par contre, *in vivo*, ce sont les cellules dendritiques

plasmacytoïdes qui contribuent majoritairement à la production d'IFN- α/β (Delhaye *et al.*, 2006). Les propriétés des IFNs de type I font qu'ils sont utilisés en clinique pour le traitement de plusieurs maladies dont l'hépatite virale, la sclérose en plaques et certains types de cancer. Toutefois les IFNs présentent une certaine toxicité lorsque administrés à des patients (Coccia *et al.*, 2006).

2.6.6.2- L'interféron gamma

L'IFN- γ est un interféron de type II principalement produit par les lymphocytes T (Th1) activés, les cellules NK activées et les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques activés (Boehm *et al.*, 1997; Takaoka et Yanai, 2006). L'IFN- γ entraîne l'activation des macrophages, l'induction de l'expression des molécules du CMH, l'augmentation de la prolifération des lymphocytes T CD4+ Th1 et des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, l'inhibition du développement des lymphocytes T CD4+ Th2 et la promotion de l'adhésion des leucocytes. L'IFN- γ a aussi des effets antiviraux et anti-prolifératifs (Billiau et Dijkmans, 1990; Munoz-Fernandez et Fresno, 1998; Takaoka et Yanai, 2006).

La production d'IFN- γ dans le SNC est principalement attribuée aux lymphocytes activés s'infiltrant à travers la barrière hémato-encéphalique (Munoz-Fernandez et Fresno, 1998). De plus, des travaux récents ont démontré que les cellules de la microglie chez la souris produisaient de l'IFN- γ en réponse aux IL-12 et -18 qui étaient sécrétées par les cellules gliales du SNC (Kawanokuchi *et al.*, 2006).

La présence d'IFN- γ dans le SNC a plusieurs effets chez les cellules résidentes. Dans le SNC, l'IFN- γ active les cellules de la microglie et augmente l'expression des molécules du CMH-II (qui ne sont pas exprimées de façon constitutive dans le SNC) à la surface des cellules de la microglie, des astrocytes et des oligodendrocytes (Munoz-Fernandez et Fresno, 1998). Il a également été démontré *in vitro* que l'IFN- γ , en plus d'induire l'expression du CMH-II, augmentait l'expression des molécules de co-stimulation (B7) chez les astrocytes, ce qui leur confèrait la capacité d'activer les lymphocytes T dans un contexte d'inflammation (Nikceovich *et al.*, 1997). L'IFN- γ induit également l'expression du CMH-I à la surface des neurones (Munoz-Fernandez et Fresno, 1998). Les effets de l'IFN- γ sur les cellules du SNC favorisent les

interactions entre ces cellules et les cellules du système immunitaire. Ces interactions peuvent, par contre, être défavorables et contribuer au développement de pathologies dans le SNC. Par exemple, l'augmentation de l'expression du CMH-I à la surface des neurones peut entraîner leur destruction en les transformant en cibles potentielles pour les lymphocytes T cytotoxiques (Munoz-Fernandez et Fresno, 1998).

2.7- La réponse immunitaire antivirale dans le SNC

Lorsqu'un virus traverse la barrière hémato-encéphalique et pénètre dans le cerveau, son interaction avec les cellules du SNC initie la réponse inflammatoire. L'activation des cellules résidentes du SNC en réponse à une infection virale se traduit par la production de différentes cytokines inflammatoires. Les cytokines précoces induites en réponse à la présence d'un virus dans le cerveau sont les interférons de type I (IFN- α/β), les interférons de type II (IFN- γ) et les cytokines inflammatoires IL-1, IL-6 et TNF- α (Munoz-Fernandez et Fresno, 1998; Rempel *et al.*, 2004). Elles sont sécrétées par plusieurs types cellulaires résidents, les principales sources de signaux pro-inflammatoires étant les astrocytes et les cellules de la microglie (Li *et al.*, 2004; Rempel *et al.*, 2005). La libération de ces molécules inflammatoires dans le cerveau suite au contact avec un virus entraîne l'augmentation de la perméabilité et de l'expression de molécules d'adhésion des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique. Il a aussi été démontré que plusieurs virus pouvaient directement augmenter l'expression des molécules d'adhésion par l'infection des cellules endothéliales (Brankin *et al.*, 1995). L'infection virale lytique des cellules endothéliales entraîne ultimement le bris de la barrière hémato-encéphalique. Ces facteurs réunis expliquent l'influx massif de leucocytes dans le cerveau en contexte d'infection virale (Brankin *et al.*, 1995). Les cellules infiltrantes sont une riche source de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ , LT- α et de nombreuses autres), ce qui crée un microenvironnement permettant d'orienter l'activité des autres cellules infiltrantes (monocytes/macrophages, lymphocytes) (Li *et al.*, 2004; Rempel *et al.*, 2005). Dans plusieurs types d'infections virales chez l'humain et l'animal, des études ont révélé que les niveaux d'IL-6 deviennent très élevés dans le cerveau. C'est notamment le cas chez l'humain lors d'infections par le HSV ou le HIV-1 et chez la

souris infectée par le virus de la chorioméningite lymphocytaire, par certains rétrovirus murins, ainsi que dans les cas d'encéphalomyélite de Theiler (Van Wagoner et Benveniste, 1999).

Malheureusement, la réponse immunitaire innée et adaptative provoquée par la présence d'un virus dans le SNC peut contribuer en elle même au développement de désordres neurologiques de nature inflammatoire (Rempel *et al.*, 2005). Ainsi, la compréhension des mécanismes viraux et immunitaires impliqués dans la pathogenèse des encéphalites virales est nécessaire au développement de traitements efficaces permettant la rémission. L'étude de la réponse immunitaire dans le SNC au niveau de la barrière hémato-encéphalique lors d'une pathologie est facilitée par les modèles expérimentaux d'infections virales du SNC (Li *et al.*, 2004).

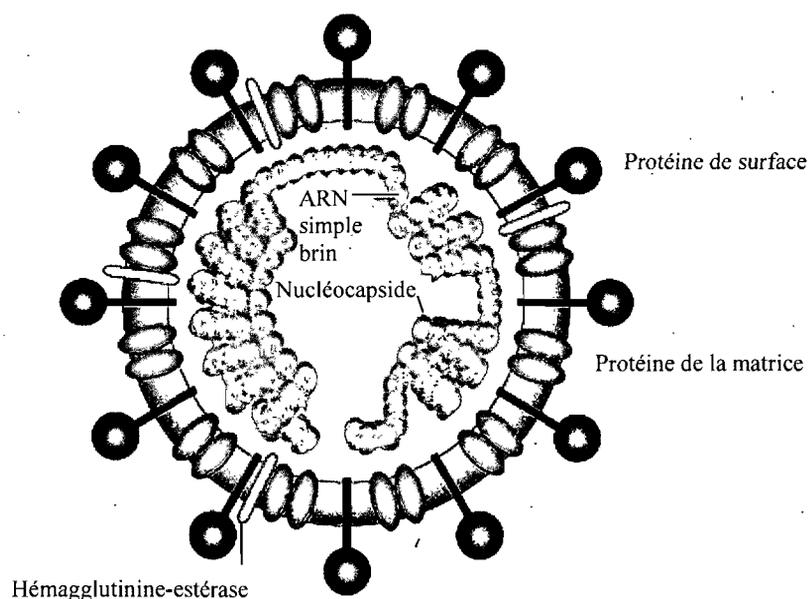
2.8- Un modèle d'étude : Les coronavirus

Afin de pouvoir étudier les mécanismes par lesquels les virus peuvent entraîner des anomalies dans le fonctionnement des cellules endothéliales et de la barrière hémato-encéphalique, il est essentiel de trouver un modèle murin de maladie neurologique virale.

2.8.1- Les coronavirus murins

Les coronavirus font partie de la famille des *coronaviridae*, de l'ordre des nidovirales. Leur nom provient de leur forme caractéristique observée en microscopie électronique, qui rappelle celle d'une couronne. Ces virus possèdent une enveloppe entourant une capsidie hélicoïdale et leur matériel génétique se présente sous la forme d'un ARN simple brin de polarité positive (de Haan *et al.*, 2005). Ce sont des virus de grande taille dont l'ARN génomique mesure de 27 à 32 kilobases (kb), ce qui leur confère le titre de plus grands virus à ARN connus à ce jour (Brian et Baric, 2005). L'ARN génomique des coronavirus est associé aux protéines de la nucléocapside ou protéines N, formant la nucléocapside hélicoïdale. La nucléocapside est enveloppée par une bicouche lipidique dans laquelle s'imbriquent les glycoprotéines de la matrice (M) et les glycoprotéines de surface (S) (Fig. 2). Certains coronavirus possèdent une troisième glycoprotéine d'enveloppe appelée hémagglutinine-estérase (HE). Les

glycoprotéines S traversent la double couche phospholipidique composant l'enveloppe du virion, mais leur portion principale est située à l'extérieur de l'enveloppe et forme de grandes projections. Ces projections, qui ressemblent à des pétales, donnent aux virions l'aspect caractéristique d'une couronne. La protéine S étant la protéine la plus externe du virus, elle joue un rôle primordial dans l'attachement du virus aux cellules cibles. La protéine M est elle aussi une glycoprotéine transmembranaire de l'enveloppe virale, mais seulement une petite région de cette protéine est exposée à la surface externe de la bicouche lipidique. Cette protéine de 20 à 30 kDa interagit avec la nucléocapside virale, favorisant le maintien de la structure du virus. Lors de la synthèse de nouveaux virions, la glycoprotéine M est aussi impliquée dans la détermination du lieu de bourgeonnement de ces virions au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique rugueux et de l'appareil de Golgi (Holmes et Lai, 1996).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

Figure 2. Structure d'un coronavirus.

Les coronavirus sont des virus enveloppés à capsidie hélicoïdale et ayant un génome composé d'ARN simple brin. L'ARN génomique est associé aux protéines de la nucléocapside. L'enveloppe virale renferme les protéines de la matrice et les protéines de surface qui forment des projections à l'extérieur du virus. Certains sérotypes viraux comportent aussi une autre protéine d'enveloppe, l'hémagglutinine-estérase (Perlman et Dandekar, 2005).

2.8.2- Maladies induites par les coronavirus chez diverses espèces animales incluant l'homme

Les coronavirus infectent plusieurs espèces de mammifères, incluant l'homme (Jacomy et Talbot, 2003). Chez l'humain, ils sont associés à environ 30 à 35% des cas de rhume et peuvent occasionnellement provoquer d'autres pathologies telles que des pneumonies, des méningites et des entérites (Jacomy et Talbot, 2003). Deux coronavirus humains causant une infection des voies respiratoires, les virus HCoV-229E et HCoV-OC43, ont été identifiés dans les années 1960. Plus récemment, entre 2003 et 2005, trois nouveaux coronavirus humains ont été répertoriés. Il s'agit des virus HCoV-NL63, HCoV-HKU1 et du coronavirus responsable du syndrome respiratoire aigu-sévère (SARS-CoV) (Pyrç *et al.*, 2007; van der Hoek, 2007). Bien que découverts en 2004 et 2005 respectivement, les coronavirus HCoV-NL63 et HCoV-HKU1 sont présents dans la population humaine depuis plus longtemps et provoquent une pathologie similaire à celle induite par les coronavirus HCoV-229E et HCoV-OC43. Par contre, le SARS-CoV est un virus émergent ayant été récemment introduit chez l'humain et il provoque une maladie pulmonaire sévère (Gu et Korteweg, 2007; van der Hoek, 2007). Plusieurs coronavirus ont aussi été répertoriés chez l'animal, dont le virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) qui cause une infection respiratoire chez le poulet, le virus de gastro-entérite transmissible (TGE) chez le porc, le virus MHV chez la souris et de nombreux autres coronavirus infectant chats, chiens, bovins ou rongeurs (Saif, 1993). Dû à leur capacité à infecter les bovins, les porcs ou les volailles, les coronavirus animaux sont souvent associés à des pertes économiques importantes (de Haan *et al.*, 2005).

2.8.3- Étapes de la réplication virale

Le cycle de réplication des coronavirus s'amorce lorsque la glycoprotéine S du virion s'attache à son récepteur spécifique sur la membrane plasmique de la cellule hôte. Cette interaction est suivie par l'entrée du virus dans la cellule par fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique ou par endocytose suivie de la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de l'endosome. Ces deux voies d'entrée ont

pour conséquence la libération de l'ARN génomique du virus dans le cytoplasme de la cellule (Holmes, 1986; Holmes et Lai, 1996; Bergmann *et al.*, 2006). L'ARN génomique étant de polarité positive, il joue le rôle d'un ARN messager (ARNm) qui est traduit en une polyprotéine. Le clivage subséquent de cette polyprotéine génère une ARN polymérase ARN dépendante. Cette enzyme transcrit l'ARN génomique viral en un ARN de polarité négative qui lui est complémentaire et qui servira de base à la synthèse d'un nouvel ARN génomique ainsi que des ARNs sous-génomiques. Tous ces ARNs de polarité positive (y compris l'ARN génomique) sont coiffés et polyadénylés (Holmes, 1986; Holmes et Lai, 1996). Les ARNs sous-génomiques, au nombre de 5 à 7 selon l'espèce virale, sont traduits pour former les protéines structurales des virions (N, M, S et HE) ainsi que des protéines non-structurales dont les rôles restent à élucider (Holmes, 1986; Bergmann *et al.*, 2006). La protéine N, synthétisée par des polyribosomes libres dans le cytoplasme, s'associe au nouvel ARN génomique et forme la nucléocapside hélicoïdale (Holmes, 1986). Les glycoprotéines M et S sont traduites par des polyribosomes au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique rugueux, puis sont transportées dans l'appareil de Golgi où elles s'accumulent pour être ensuite incorporées dans les virions (Holmes et Lai, 1996). Un excès de protéines S est aussi acheminé vers la membrane plasmique (Bergmann *et al.*, 2006). La protéine HE est seulement présente chez certains coronavirus (Holmes et Lai, 1996). Suite à la synthèse et à l'assemblage de toutes les protéines virales, les virions sont formés et ils bourgeonnent à partir des membranes du Golgi ou du réticulum endoplasmique rugueux. Ils sont relâchés hors de la cellule lorsque cette dernière est lysée ou par fusion des vésicules post-golgiques avec la membrane plasmique (Holmes et Lai, 1996).

2.9- Le virus de l'hépatite murine (MHV)

2.9.1- Caractéristiques des MHV

Le MHV est un pathogène naturel chez la souris. Ce coronavirus murin se caractérise par un génome composé d'ARN de polarité positive coiffé et polyadénylé dont la taille est d'approximativement 31 kb, d'une capsidie hélicoïdale composée de protéines N liées à l'ARN génomique et d'une enveloppe dans laquelle sont imbriquées

les protéines M, S et, chez certaines souches de MHV seulement, les protéines HE (Holmes et Lai, 1996). La glycoprotéine S des virus MHV interagit avec le récepteur cellulaire murin CEACAM-1 (voir section 2.9.7), ce qui permet aux virus de s'attacher aux cellules-cibles afin d'y entrer par fusion membranaire. Chez les souches de MHV qui possèdent la protéine HE, cette protéine participe aussi au processus d'attachement et de fusion des virions avec leurs cellules-cibles. La réplication primaire des MHVs a lieu au niveau du tractus gastro-intestinal et du foie ou au niveau des voies respiratoires supérieures, selon les souches (Guenet, 2005; Bergmann *et al.*, 2006). Les MHV sont donc généralement responsables d'infections entériques, respiratoires et hépatiques, mais ils peuvent aussi provoquer des maladies aiguës ou chroniques démyélinisantes du SNC (Williams *et al.*, 1990).

2.9.2- Diversité des sérotypes et des pathologies

Les différentes souches du virus MHV ne peuvent pas être catégorisées d'une manière bien définie en fonction des organes cibles et de la maladie provoquée, puisque plusieurs organes peuvent être affectés par une même souche virale et que la pathologie induite dépend de la voie d'administration du virus (intracrânienne, intranasale, intrapéritonéale, etc.), de l'âge de l'hôte et de sa susceptibilité génétique (Iacono *et al.*, 2006). Toutefois, certaines distinctions dans le tropisme et la pathogenèse des souches de MHV peuvent être relevées. Les souches MHV-1, MHV-2 et MHV-3 se caractérisent par un tropisme plus marqué pour le foie que la souche MHV-JHM (ou MHV-4). Cette dernière affiche toutefois un fort neurotropisme. Certaines souches de MHV peuvent infecter autant le foie que le système nerveux central, ce qui est le cas du MHV-A59 et du MHV3 (Virelizier *et al.*, 1975; Lavi *et al.*, 1984). Les souches virales MHV-A59 et MHV-JHM sont généralement utilisées comme modèle pour des études portant sur l'infection du système nerveux central, alors que les virus MHV-3 sont mieux connus comme modèles d'hépatite (Matthews *et al.*, 2002).

2.9.3- Pathogenèse du MHV-A59

L'infection intracérébrale ou intranasale des souris susceptibles avec le sérotype MHV-A59 provoque une méningo-encéphalite et une hépatite aiguë survenant dans les

deux premières semaines d'infection. Durant cette période, il y a également une importante diminution transitoire du nombre de cellules au niveau du thymus, de la rate et des ganglions (Cray *et al.*, 1993). Le virus est par la suite éliminé rapidement du foie après 8 à 10 jours post-infection. Dans le cerveau des souris immunocompétentes, le virus infectieux n'est plus détecté après 16 à 20 jours post-infection. Toutefois, une faible quantité de protéines virales peut être détectée dans le SNC, par immunofluorescence, jusqu'à 3 mois post-infection et l'ARN viral peut être retrouvé durant plus de 6 mois post-infection (Lavi *et al.*, 1984; Matthews *et al.*, 2001). Suite à la phase aiguë d'infection, il peut y avoir apparition d'une maladie chronique caractérisée par des lésions de démyélinisation dans le SNC et la moelle épinière. Ces lésions apparaissent après 3 ou 4 semaines d'infection et durent plus de 6 mois (Matthews *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004; Rempel *et al.*, 2004). Cette maladie chronique pourrait être induite par la persistance du MHV-A59 dans certaines cellules permissives du SNC et par la réplication virale à un faible niveau (Lavi *et al.*, 1984).

2.9.4- Pathogenèse du MHV-JHM

Le MHV-JHM est un sérotype de MHV très neurotrophique. Comparativement à la souche MHV-A59 moins neurovirulente, le MHV-JHM se propage beaucoup plus rapidement dans le SNC suite à l'infection par voie intracrânienne ou intranasale (Rempel *et al.*, 2005). Il provoque chez les souris infectées une encéphalomyélite aiguë ainsi qu'une maladie démyélinisante aiguë et chronique (Sun *et al.*, 1995). L'injection intracrânienne du MHV-JHM chez les souris susceptibles C57BL/6 entraîne une encéphalite fatale en 7 à 10 jours (Rempel *et al.*, 2005). Dans certaines conditions, des souris survivent à l'encéphalite aiguë due au MHV-JHM (Haring et Perlman, 2001). Le MHV-JHM persiste alors dans le SNC et cause une encéphalomyélite démyélinisante chronique montrant des ressemblances avec la sclérose en plaques humaine (Sun *et al.*, 1995). La démyélinisation croissante entraîne graduellement la paralysie des membres inférieurs et ultimement, la mort de l'animal (Sun *et al.*, 1995). Les oligodendrocytes et les astrocytes sont les principales cibles cellulaires du MHV-JHM durant les infections aiguës et chroniques, mais ce virus infecte aussi les neurones, les cellules endothéliales et les cellules épendymales

(Lampert *et al.*, 1973; Fleury *et al.*, 1980). La phase aiguë de démyélinisation est provoquée par la lyse des oligodendrocytes par le virus et la réponse immunitaire contre les oligodendrocytes infectés. Dans le cas de l'infection chronique, la plupart des cellules infectées sont des astrocytes et les mécanismes impliqués dans la démyélinisation chronique sont moins bien caractérisés et seraient associés à une réponse adaptative chronique (Sun *et al.*, 1995).

2.9.5- Le sérotype MHV3

2.9.5.1- Pathogenèse du MHV3

Les souris génétiquement susceptibles à l'infection par le MHV3 (BALB/c, C57BL/6) servent de modèle pour l'étude de l'hépatite aiguë virale (Haring et Perlman, 2001). En effet, l'infection de ces souris au MHV3 par voie intra péritonéale entraîne une hépatite fulminante provoquant la mort de tous les animaux infectés en moins d'une semaine (Virelizier *et al.*, 1975). Chez les souches murines de susceptibilité génétique intermédiaire, l'injection intrapéritonéale de virus MHV3 entraîne également une hépatite à laquelle toutefois certaines souris survivent (Tardieu *et al.*, 1986). La survie des souris semi-susceptibles à la maladie aiguë induite par le MHV3 est suivie par le développement d'une maladie neurologique chronique. De trois à quatre semaines après l'infection, les souris développent une méningite, une épendymite et une encéphalite se manifestant par la paralysie graduelle des membres inférieurs (Tardieu *et al.*, 1986). Après la phase aiguë de la maladie, il se produit une immunodéficience progressive chez l'animal alors que le virus MHV3 n'est pas complètement éliminé. Le MHV3 peut être détecté jusqu'à trois mois post-infection dans le cerveau, le foie, la rate et les ganglions de la majorité des souris infectées (Lamontagne et Dupuy, 1985). La maladie chronique peut perdurer jusqu'à 12 mois avant le décès de l'animal (Virelizier *et al.*, 1975).

2.9.5.2- Les caractéristiques des variants du MHV3 isolés du SNC

À partir du sérotype de MHV3, plusieurs variants ont été générés. Le L2-MHV3 a été isolé de cellules L2 infectées avec un extrait de foies de souris DBA-2 infectées durant 3 jours. Ce variant du MHV3 est extrêmement hépatotropique chez

des souris susceptibles, mais induit une maladie neurologique chez les souris semi-susceptibles. Le C43-MHV3 a été isolé du cerveau de souris semi-susceptibles C3H infectées avec la souche L2-MHV3 lors d'une infection chronique depuis 105 jours (Lamontagne *et al.*, 1990). Le variant C43-MHV3, lorsque réinjecté à des souris susceptibles, cause une hépatite aiguë mais seulement à des doses beaucoup plus fortes que celles nécessaires avec le virus parental (Lamontagne *et al.*, 1990). L'infection *in vitro* de cellules L2 avec le virus C43-MHV3 ou le L2-MHV3 a permis de montrer que le virus C43-MHV3 possédait un cycle de replication plus lent que celui du virus parental, se manifestant surtout par un développement tardif des effets cytopathiques (fusion cellulaire) et un titre viral plus faible. Le virus C43-MHV3 était capable d'influencer la cinétique de la production d'actine par la cellule hôte, une propriété qui pourrait être reliée à la capacité de persistance *in vivo* du virus (Lamontagne *et al.*, 1990).

2.9.6- Susceptibilité génétique de l'hôte

La susceptibilité à l'infection, le type de pathologie et le niveau de réponse immunitaire induite par les virus MHV diffèrent selon les caractéristiques de l'animal. L'âge de l'animal, son statut immunitaire, mais aussi ses prédispositions génétiques influencent l'évolution de la maladie (Lamontagne et Dupuy, 1985; Lardans *et al.*, 1996). Les souris BALB/c et C57BL/6 sont génétiquement susceptibles à l'infection par les virus MHV (Haring et Perlman, 2001). Il existe également des souches murines complètement résistantes à l'infection par les MHVs. Des études ont montré l'apparition de la résistance des souris A/J à l'infection par les virus MHV-3 après l'âge de 3 semaines (Levy-Leblond et Dupuy, 1977). De plus, des souris « knock out » pour la molécule CEACAM-1 (le récepteur viral) ont été produites et il a été démontré que ces souris étaient totalement résistantes à l'infection par voie intracrânienne par le virus MHV-A59 (Hemmila *et al.*, 2004). Certaines souches murines (C3H, A2G, SJL) possèdent une susceptibilité intermédiaire à l'infection par les MHV. Par exemple, les souris SJL résistent à l'infection par le MHV-A59 jusqu'à une dose virale mille fois supérieure à la dose létale du MHV-A59 pour les souris susceptibles (Guenet, 2005). Ces souris survivent aussi à l'hépatite aiguë induite par le virus MHV3, mais elles

développent par la suite une maladie neurologique chronique (Virelizier *et al.*, 1975). Les différences génétiques de ces souches murines ont été étudiées afin d'identifier certains des facteurs déterminant la susceptibilité à l'infection. Les souris C57BL/6 (susceptibles) et SJL (semi-résistantes) montrent une différence importante au niveau de la structure de la molécule CEACAM-1, identifiée comme étant le récepteur aux MHV. Cette différence se situe au niveau de la région N-terminale de type immunoglobuline (Ig) de la molécule, qui correspond à la région de fixation du virus (Coutelier *et al.*, 1994). Le CEACAM-1 (aussi appelée Bgp1 ou CD66a) existe en effet sous deux formes alléliques. Les souris C57BL/6 (susceptibles) expriment le CEACAM-1a alors que les souris SJL (semi-résistantes) expriment la forme CEACAM-1b (Godfraind *et al.*, 1995).

2.9.7- Le récepteur viral : la molécule CEACAM-1

Le CEACAM-1 est une molécule de la superfamille des immunoglobulines (Singer *et al.*, 2002; Markel *et al.*, 2004). Cette protéine transmembranaire est retrouvée chez l'humain et chez la souris. Alors que le CEACAM-1a est la forme exprimée chez la plupart des lignées de souris, dont la lignée C57BL/6, le CEACAM-1b est le plus répandu chez les souris sauvages (Nakagaki *et al.*, 2005). Chez la souris, le CEACAM-1 est exprimé à la surface de plusieurs types cellulaires dont les macrophages, les granulocytes, les lymphocytes T activés, les lymphocytes B, les cellules NK, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales (Kammerer *et al.*, 2001; Singer *et al.*, 2002; Nagaishi *et al.*, 2006). Dans le SNC, l'expression du récepteur CEACAM-1 est toutefois limitée aux cellules de la microglie et aux cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (Godfraind *et al.*, 1997; Muller *et al.*, 2005; Nakagaki *et al.*, 2005).

Bien que les souris « knock out » pour le gène *Ceacam-1* soient viables et en bonne santé, la molécule CEACAM-1 a tout de même plusieurs rôles biologiques importants. Elle peut médier l'adhésion intercellulaire par des interactions homophiliques. Il constitue également une molécule régulatrice de la prolifération cellulaire, de la croissance tumorale, de l'angiogénèse et de la production de métastases (Markel *et al.*, 2004). Le CEACAM-1 est aussi un modulateur de la réponse

immunitaire innée et adaptative. Il est engagé dans le contrôle des fonctions des cellules dendritiques, de la cytotoxicité médiée par les lymphocytes T et de l'activation des granulocytes (Kammerer *et al.*, 2001; Singer *et al.*, 2002). De plus, le CEACAM-1 constitue un récepteur de co-inhibition chez les lymphocytes T activées. Nagaishi et ses collaborateurs (2006) ont démontré que l'engagement du récepteur CEACAM-1 à la surface des lymphocytes T murins induisait un signal intracellulaire résultant en une inhibition de la sécrétion de cytokines. Le CEACAM-1 est également impliqué dans des interactions avec certains pathogènes. En effet, le CEACAM-1 humain constitue un récepteur pour plusieurs bactéries pathogènes, alors que le CEACAM-1a murin sert de récepteur d'entrée cellulaire pour le virus MHV (Hemmila *et al.*, 2004; Nakagaki *et al.*, 2005).

2.9.8- Le tropisme cellulaire des virus MHV

2.9.8.1- Le virus MHV3

Le virus MHV3 est à la fois hépatotrope, neurotrope et lymphotrope (Virelizier *et al.*, 1975; Lardans *et al.*, 1996). Au niveau du foie, le MHV3 possède la capacité d'infecter les hépatocytes, les cellules endothéliales et les cellules de Kupffer, qui expriment toutes le récepteur CEACAM-1 (Godfraind *et al.*, 1995; Lamontagne *et al.*, 1996). Le MHV3 a aussi un tropisme pour les cellules thymiques, spléniques et myéloïdes telles que les macrophages, les lymphocytes B et pré-B et les cellules dendritiques thymiques, qui expriment aussi le CEACAM-1 (Jolicoeur et Lamontagne, 1990; Godfraind *et al.*, 1998). En 2004, Lehoux et ses collègues ont montré que les cellules NK représentaient également une cible pour le virus. Les macrophages de plusieurs organes sont des cibles pour l'infection par le virus MHV3. En plus d'infecter les cellules de Kupffer (les macrophages hépatiques), des études *in vitro* ont montré que le virus MHV3 se répliquait de manière importante dans les macrophages péritonéaux et myéloïdes des souris susceptibles C57BL/6 et qu'il provoquait la formation de syncytia (cellules géantes multinuclées issues de la fusion entre plusieurs cellules) (Schindler *et al.*, 1983; Lamontagne et Dupuy, 1985). Chez les souris de susceptibilité génétique intermédiaire au virus MHV3, telles que les souris C3H ou SJL, l'infection *in vitro* des macrophages péritonéaux provoquait des effets

cytopathiques d'intensité moindre. Aussi, la présence d'antigènes dans le cytoplasme et les niveaux de réplication virale étaient inférieurs à ce qui était observé lors de l'infection de macrophages de souris génétiquement susceptibles (Virelizier et Allison, 1976). D'autre part, il n'y a que peu ou pas d'expression du récepteur viral chez les lymphocytes T (Coutelier *et al.*, 1994). Par contre, les lymphocytes thymiques des souris susceptibles montrent une apoptose importante suite à la mort des cellules dendritiques thymiques infectées par le virus (Lamontagne et Jolicoeur, 1991). Bien que les lymphocytes T ne supportent pas la réplication virale, le MHV3 peut se répliquer dans des cellules lymphoïdes en lignée continue, telles que les cellules YAC. Ces cellules peuvent même supporter une infection virale persistante (Lamontagne et Dupuy, 1984a).

D'autre part, lors d'infections *in vitro*, plus de 80% des lymphocytes B spléniques étaient infectées alors que moins de 9% des thymocytes exprimaient des protéines virales et produisaient du virus à faible titre (Lamontagne et Jolicoeur, 1991). Les lymphocytes pré-B et B de la moelle osseuse pouvaient supporter la réplication virale et former des syncytia ou mourir par apoptose ou nécrose (Jolicoeur et Lamontagne, 1990).

Dans le SNC, il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que le MHV3 possédait un tropisme pour les cellules épendymales, les cellules méningeales et les neurones. Le virus MHV3 n'infectent toutefois pas les oligodendrocytes ou les astrocytes de souris semi-susceptibles en culture (Tardieu *et al.*, 1986). Au niveau de la barrière hémato-encéphalique, des études ont révélé la présence du récepteur viral chez les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins cérébraux (Godfraind *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 2005). Toutefois, la capacité du virus MHV3 à se répliquer dans ces cellules n'a pas encore été démontrée.

2.9.8.2- Les virus MHV-A59 et MHV-JHM

Comme c'est le cas pour le virus MHV3, le tropisme cellulaire du MHV-A59 corrèle largement avec l'expression du récepteur CEACAM-1a à la surface des cellules. Nakagaki et ses collègues (2005) ont étudié la distribution du CEACAM-1 dans plusieurs tissus et cette distribution coïncide la plupart du temps avec la

distribution des protéines virales du MHV-A59. Ainsi, les macrophages de la rate et du foie sont les premières cellules à être infectées par le MHV-A59 *in vivo* (Wijburg *et al.*, 1997). Dans le foie, les hépatocytes et les cellules endothéliales sont aussi des cibles de l'infection par le MHV-A59, ce qui entraîne le développement de l'hépatite (Godfraind et Coutelier, 1998). Par contre, les cellules endothéliales cérébrales exprimant le récepteur CEACAM-1a ne seraient pas infectées par le virus MHV-A59, empêchant la dissémination du virus dans le SNC (Godfraind et Coutelier, 1998). Le virus MHV-A59 induit aussi une atrophie thymique causée indirectement par l'infection des cellules épithéliales thymiques. D'autre part, l'interaction entre le MHV-A59 et les lymphocytes B entraîne leur activation polyclonale et la sécrétion de cytokines. Il a été suggéré par Godfraind et Coutelier (1998) que l'interaction du virus MHV-A59 avec son récepteur pourrait entraîner soit la lyse cellulaire, soit des altérations fonctionnelles des cellules.

Le tropisme viral ne dépend pas uniquement du récepteur puisque le sérotype MHV-JHM induit une encéphalomyélite sévère caractérisée par l'infection des cellules de la microglie, mais aussi des astrocytes, des oligodendrocytes, des neurones et des cellules épendymales, alors que seules les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique et les cellules de la microglie expriment le récepteur viral au niveau du SNC (Muller *et al.*, 2005; Nakagaki *et al.*, 2005). Une étude récente a permis de démontrer que les souris *Ceacam-1a*^{-/-} étaient susceptibles à l'infection par le virus MHV-JHM (Miura *et al.*, 2008). Bien que des observations provenant de plusieurs laboratoires suggèrent que le virus MHV-A59 puisse infecter les astrocytes, les oligodendrocytes et les neurones, les souris *Ceacam-1a*^{-/-} sont demeurées résistantes à l'infection par le MHV-A59 (Hemmila *et al.*, 2004; Rempel *et al.*, 2004).

2.9.9- La réponse immunitaire anti-virale lors des infections aux virus MHV

2.9.9.1- L'infection aiguë

L'infection par le virus MHV3 par les voies intrapéritonéale ou orale débute dans les cellules hépatiques, mais les virus produits se disséminent rapidement dans tous les organes via la voie sanguine. La réponse des cellules NK de la moelle osseuse et de la rate est sollicitée mais ces cellules sont permissives aux virus et meurent par

apoptose (Lehoux *et al.*, 2004). La production d'IFN- γ dans le foie et la rate est aussi diminuée dans les premières 48 heures (Jacques *et al.*, 2008). Normalement, la réponse immunitaire cellulaire médiée par les lymphocytes T helper et cytotoxiques est impliquée dans le processus d'élimination virale, mais elle dépend du bon fonctionnement du thymus. Il a été montré que le thymus était atrophié dans les premières 48 heures et il se produisait une diminution des lymphocytes spléniques (Prevost *et al.*, 1975). De plus, les lymphocytes T répondaient moins bien à la stimulation par la concanavaline A (ConA), indiquant des altérations fonctionnelles chez ces cellules (Krzystyniak et Dupuy, 1983). D'autre part, les lymphocytes B diminuaient en nombre autant dans la rate que dans la moelle osseuse (Jolicoeur et Lamontagne, 1990). Chez les souris semi-susceptibles survivant quelques semaines, les anticorps produits contre le virus n'appartiennent qu'aux IgM et il n'y a pas de commutation isotypique en IgG (Krzystyniak et Dupuy, 1983). Ces observations indiquent une immunodéficience sévère entraînée par l'infection virale.

D'autre part, l'inoculation intracrânienne de souris susceptibles au virus MHV-JHM entraîne la production de MIP-1 (macrophage inflammatory protein) et d'IL-6 par les cellules résidentes du SNC après 3 jours d'infection (Rempel *et al.*, 2005). La libération de chimiokines provoque par la suite le recrutement d'une population de leucocytes majoritairement composée de macrophages provenant de la moelle osseuse (Matthews *et al.*, 2001; Rempel *et al.*, 2005). Durant l'infection par le virus MHV-JHM, les lymphocytes sont aussi recrutés dans le cerveau vers le jour 5 post-infection, et des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques sont détectables vers le 7^e jour (Rempel *et al.*, 2004). L'infiltration des leucocytes atteint son apogée entre 5 à 8 jours post-infection et décline ensuite, bien que le virus n'ait pas été totalement éradiqué (Matthews *et al.*, 2001; Rempel *et al.*, 2005).

L'équipe du Dr Buchmeier a étudié les différences dans la réponse immunitaire induite par les virus MHV-JHM et MHV-A59 dans le cerveau de souris durant la première semaine post-infection (Rempel *et al.*, 2004). Ils ont observé une forte augmentation de l'ARNm du TNF- α suite à l'infection dans les deux cas. Par contre, l'ARNm de l'IL-12 et de l'IFN- γ ont été détectés jusqu'au 5^e jour post-infection seulement chez les souris infectées par le MHV-A59, alors qu'ils n'ont pas été détectés

durant cette période dans le cerveau des animaux infectés par le MHV-JHM (Rempel *et al.*, 2004). Une différence importante a également été notée dans les pourcentages de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques présents dans le cerveau au 7^e jour d'infection, qui étaient plus élevés chez les souris infectées par le MHV-A59 que celles infectées par le MHV-JHM. Les pourcentages de lymphocytes T CD4⁺ étaient toutefois similaires et les pourcentages de macrophages étaient plus élevés suite à l'infection par le MHV-JHM (Rempel *et al.*, 2004). La production précoce d'IFN- γ et d'IL-12 dans le cerveau des souris infectées ainsi que le recrutement de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques au site d'infection pourraient donc être des éléments participant à maîtriser partiellement la réplication virale et l'invasion du MHV-A59 dans le cerveau. D'autre part, le recrutement accru de macrophages au cours de l'infection par le MHV-JHM ne semble pas protecteur (Rempel *et al.*, 2004).

2.9.9.2- L'infection chronique

Les souris de lignée génétiquement semi-susceptibles comme les souris C3H ou SJL, suite à l'infection aiguë par les virus MHV3, développe une maladie neurologique chronique qui se caractérise par tous les éléments d'immunodéficience humorale et cellulaire observés lors de l'infection aiguë, mais à un niveau moins élevé, favorisant à la fois la persistance du virus et la survie de l'animal (Lamontagne *et al.*, 1989). Par contre, les mécanismes immunitaires déficients dans le SNC et favorisant le développement de la maladie neurologique induite par le virus MHV3 sont encore peu connus.

Par contre, il a été démontré que la réponse immunitaire anti-virale contre le virus neurotrope MHV-JHM était associée à une réponse cytotoxique des lymphocytes CD8⁺ protectrice plutôt qu'à une réponse humorale, quoique cette dernière diminuait la maladie mais sans empêcher la persistance virale (Lin *et al.*, 1997; Stohlman *et al.*, 1998; Bergmann *et al.*, 1999). Chez les souris survivant à l'infection aiguë induite par le MHV-JHM et développant une infection chronique, des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ persistent dans le SNC jusqu'à 34 jours post-infection (p.i.) puis diminuent avec le temps (Stohlman *et al.*, 1998). Après 45 jours p.i., encore près de 50% des lymphocytes T CD8⁺ retrouvés dans le SNC sont spécifiques du virus, soit la même

proportion que lors de l'infection aiguë (Bergmann *et al.*, 1999). Ces cellules sécrètent de l'IFN- γ , mais leurs propriétés cytotoxiques sont graduellement diminuées (Bergmann *et al.*, 1999). Le virus MHV-JHM peut être éliminé ou persister, mais dans les deux cas la maladie démyélinisante chronique se développe (Houtman et Fleming, 1996). Les mécanismes par lesquels cette démyélinisation se produit demeurent peu connus, bien que plusieurs observations suggèrent que des lymphocytes T et des macrophages retrouvés à proximité des lésions soient très impliqués (Houtman et Fleming, 1996; Wu et Perlman, 1999).

D'autre part, la maladie démyélinisante chronique associée à l'infection du SNC par le virus MHV-A59 se développe de 3 à 4 semaines après l'infection virale par voie intracrânienne ou intranasale, mais non pas par voie intrapéritonéale, suggérant que la non-permissivité des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique puisse prévenir la dissémination du MHV-A59 dans le cerveau (Godfraind et Coutelier, 1998). Toutefois, les mécanismes effecteurs responsables de la démyélinisation ne sont pas encore élucidés.

2.9.9.3- La persistance virale

Le MHV peut causer une infection lytique (apoptose ou nécrose) dans plusieurs des types cellulaires qu'il infecte. La relation entre un virus et ses cellules-cibles détermine le cours d'une infection. Une infection virale sans lyse cellulaire favorise l'établissement de la persistance virale (Liu et Zhang, 2005).

Un état d'immunodéficience se produisant dès le début de l'infection virale, comme c'est le cas dans les infections avec les MHV, peut entraîner une diminution dans la capacité de l'hôte à éliminer le virus, favorisant ainsi la maladie chronique et la persistance virale (Lamontagne *et al.*, 1996). La suppression de l'immunité humorale et cellulaire est une caractéristique de la maladie induite par les coronavirus murins, ce qui explique leur forte tendance à établir une persistance virale *in vitro* et *in vivo* et à provoquer une maladie chronique (Lucas *et al.*, 1977; Stohlman et Weiner, 1978). Ainsi, l'infection des souris de susceptibilité intermédiaire par le virus MHV3 provoque une maladie chronique avec persistance virale, puisque le virus MHV3 peut

être retrouvé dans le cerveau, le foie, la rate et les ganglions lymphatiques durant les trois premiers mois après l'infection (Lamontagne et Dupuy, 1984b).

L'infection du SNC par des coronavirus murins illustre la contribution à la fois de la réponse immunitaire innée et des mécanismes effecteurs spécifiques qui contrôlent la réplication virale dans le SNC. Malgré le contrôle partiel de l'infection aiguë par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, des mécanismes de régulation de l'hôte probablement destinés à protéger l'intégrité du SNC contribuent à l'échec de l'élimination virale. Les mécanismes effecteurs cytolytiques exprimés durant l'infection aiguë sont remplacés durant la phase de persistance par une réponse immunitaire humorale non-lytique impliquée dans la suppression incomplète de la réplication virale (Bergmann *et al.*, 2006). Peu de choses sont actuellement connues sur les mécanismes de persistance virale du MHV dans le SNC et sur les interactions entre les virus persistants et leurs cellules-cibles (Liu et Zhang, 2005).

2.10- Hypothèses

La barrière hémato-encéphalique est un élément majeur dans le développement des pathologies infectieuses dans le SNC, particulièrement celles provenant par la voie sanguine. Les macrophages périvasculaires sont très réactionnels et produisent du TNF- α dès le début des lésions. Cette cytokine agit directement sur les cellules endothéliales, augmentant le niveau d'expression des molécules d'adhésion et favorisant le recrutement leucocytaire. Par contre, ces effets peuvent être avantageux ou au détriment de l'hôte lors d'infections virales. La compréhension plus complète des anomalies dans les mécanismes immunitaires induits lors de pathologies du SNC devient essentielle et nécessite un modèle animal d'infection (Konsman *et al.*, 2007).

Lors de l'infection par les coronavirus, les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique constituent le premier contact entre les virus et le SNC. La susceptibilité de ces cellules à l'infection par le virus pourrait entraîner des altérations fonctionnelles dans la production de cytokines inflammatoires. Ces altérations fonctionnelles pourraient se traduire en un bris majeur de la tolérance immunologique du SNC favorisant une réponse inflammatoire anormale et une aggravation des lésions plutôt qu'un processus d'élimination virale efficace (Benveniste et Benos, 1995).

Ainsi, des macrophages et des lymphocytes T et B recrutés pourraient à leur tour induire des réponses cellulaires et humorales inefficaces favorisant plutôt la persistance virale. Leur activation pourrait résulter en une production supplémentaire de cytokines inflammatoires dans l'environnement, influençant subséquemment l'intégrité des cellules de la barrière hémato-encéphalique. La susceptibilité des macrophages et des lymphocytes à l'infection par les virus de l'hépatite murine pourrait aussi entraîner un dérèglement dans la fonction de ces cellules. Entre autre, la susceptibilité des macrophages à l'infection virale pourrait entraîner une dysfonction dans la production de cytokines macrophagiques, influençant par la suite la survie et la fonction des lymphocytes.

Comme les cellules endothéliales cérébrales et les macrophages sont connus pour posséder le récepteur CEACAM-1 ainsi que d'autres récepteurs, dont le TLR2 et les récepteurs héparanes sulfates, la fixation potentielle de la protéine virale S à ces récepteurs pourrait entraîner l'induction de plusieurs cytokines inflammatoires. Par contre, la permissivité des cellules endothéliales et des macrophages à certains sérotypes de virus MHV, dont le MHV3, pourrait plutôt empêcher la production de cytokines anti-virales suite à la réplication virale et à la mort cellulaire par apoptose ou par fusion cellulaire.

Au cours de ce travail, nous allons tenter d'identifier les anomalies fonctionnelles des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de différentes lignées de souris exprimant ou non le CEACAM-1a au niveau de la nature des cytokines induites en présence de différents sérotypes neurotropes du virus MHV. Nous allons comparer la réponse des cellules endothéliales cérébrales de souris C57BL/6 susceptibles, de souris SJL semi-susceptibles et de souris *Ceacam-1a*^{-/-} résistantes aux virus MHV. Nous allons notamment montrer que les cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux non seulement supportent une infection persistante avec les virus les plus virulents, mais que la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires est inhibée ou stimulée, selon la nature du virus et l'allèle du récepteur CEACAM-1. De plus, la modulation des cytokines induites par ces virus serait partiellement associée à des récepteurs héparanes sulfates et TLR2.

Aussi, les effets de ces différents virus sur les fonctions inflammatoires des macrophages normalement recrutés seront étudiés et leurs effets sur les lymphocytes seront modélisés *in vitro*.

Les résultats obtenus permettront d'identifier les anomalies fonctionnelles jouant un rôle majeur dans le développement de la maladie neurologique induite par les coronavirus.

3- MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1- Souris

Des souris femelles C57BL/6 et SJL âgées de 8 à 12 semaines en provenance des Laboratoires Charles River (St-Constant, Qc, Canada) ont été utilisées comme sources de cellules de la moelle osseuse et de la rate pour les expériences *in vitro*. Des souriceaux de 1 à 3 jours nés de femelles gestantes C57BL/6 et SJL provenant des Laboratoires Charles River (St-Constant, Qc, Canada) ainsi que des souriceaux *Ceacam-1a-/-* produits au laboratoire du Dr Nicole Beauchemin (Université McGill, Qc, Canada) ont servi à l'élaboration de cultures primaires de cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux. Les animaux ont été euthanasiés par dislocation cervicale ou inhalation de CO₂ en conformité avec les bonnes pratiques établies par le Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) de l'Université du Québec à Montréal (protocole CIPA no 541).

3.2- Virus

Le virus L2-MHV3 provient de cellules L2 infectées par un extrait de foies de souris DBA-2 infectées durant 3 jours par le virus MHV3. Les suspensions virales ont subi 5 passages sur des cellules L2. Le variant C43-MHV3 a été isolé à partir du cerveau de souris C3H infectées par le virus L2-MHV3 durant 105 jours (Lamontagne *et al.*, 1990). Il a été utilisé après 4 passages sur des cellules L2. Le virus MHV-A59 a été gracieusement fourni par Dr Pierre Talbot (Institut Armand-Frappier, Qc, Canada). Il a été utilisé après 2 passages sur des cellules L2.

3.3- Titrage viral

Le titrage des virus a été effectué selon la méthode des dilutions limites. Les surnageants de cellules infectées ont d'abord été dilués jusqu'à 10⁻⁸ par bonds décimaux. Chaque dilution décimale a été mise en contact avec des cellules L2 en culture dans des plaques de 96 puits. Après une incubation de 72 heures à 37°C, l'absence (Fig. 3A) ou la présence (Fig. 3B) d'effets cytopathiques chez les cellules L2 a été notée dans chacun des puits. Les effets cytopathiques observables chez les cellules L2 suite à l'infection sont notamment l'arrondissement et le décollement des

cellules et la formation de syncytia. Le titre viral a été calculé à l'aide de la formule de Reed et Muench et les résultats ont été exprimés en \log_{10} DICT₅₀/mL.

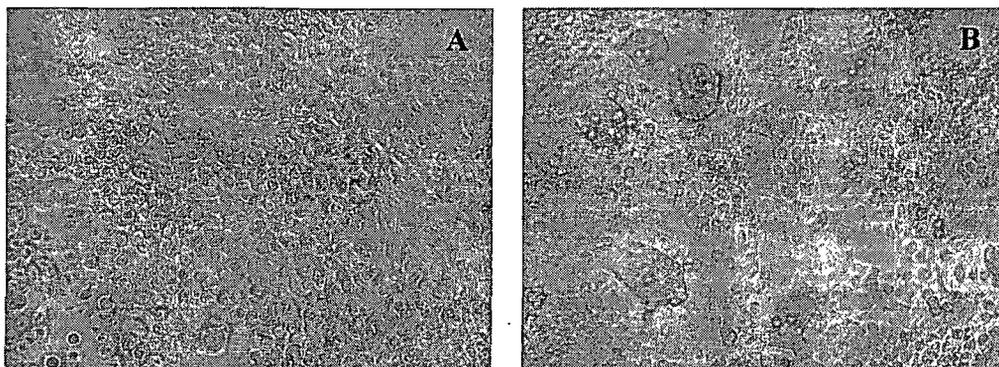


Figure 3. Effets cytopathiques engendrés par l'infection des cellules L2 par les virus MHV.

La morphologie normale des cellules L2 en culture, telle qu'observée au microscope à contraste de phase (A), est affectée par l'infection par les virus MHV, dont le C43-MHV3 (B).

3.4- Prélèvement des organes et isolement des cellules

3.4.1- Prélèvement des cellules myéloïdes et isolement des macrophages

Les souris ont été euthanasiées puis aspergées d'éthanol à 70%. Les pattes postérieures des souris ont été dénudées de leur chair et sectionnées à la hanche et au genou de manière à récupérer l'os fémoral. Les deux extrémités du fémur ont par la suite été coupées afin que l'intérieur de l'os soit accessible par les deux extrémités. À l'aide d'une seringue de 1.0cc, 1mL de RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA), additionné de pénicilline (100U/mL), de streptomycine (100 μ g/mL), de L-glutamine (2mM) et de 2- β -mercaptoéthanol (10^{-5} M) (Gibco Laboratories) et contenant 20% de sérum de veau fœtal (SVF) (Hyclone Laboratories, Professional Diagnostic, Alberta, Canada) a été injecté à l'intérieur de l'os par l'une des extrémités afin d'expulser la moelle par l'autre extrémité. Les amas cellulaires de moelle osseuse ont ensuite été dissociés par aspiration et refoulement dans la seringue. La suspension cellulaire de moelle osseuse a été déposée sur un coussin de 10mL de SVF (Hyclone Laboratories) et les débris de grande taille ont été éliminés par sédimentation durant 10 minutes sur glace. La partie supérieure du gradient de SVF a été centrifugée durant 10 minutes à 300g et le culot de cette centrifugation a été suspendu dans 1mL de tampon

de lyse à globules rouges (Sigma-Aldrich, Oakville, On, Canada) durant 2 minutes sur glace. L'action du tampon de lyse a été stoppée par l'ajout de 10mL de milieu complet contenant 20% de SVF (Hyclone Laboratories). La suspension cellulaire a été centrifugée durant 10 minutes à 1500 rpm. Le culot cellulaire a été resuspendu à une concentration de 5×10^6 cellules/ml dans du milieu complet contenant 20% de SVF (Hyclone Laboratories). Les cellules ont été cultivées à une concentration de 5×10^6 cellules par puit dans une plaque de culture de 24 puits durant 3 heures à 37°C et 5% CO₂ pour permettre l'adhésion des macrophages. Les cellules non-adhérentes, représentant approximativement 90% du total de cellules, ont été éliminées par rinçage avec du milieu complet. Les macrophages ont été cultivées dans 1mL de milieu complet contenant 5% de SVF (Hyclone Laboratories) pour les différents traitements et les infections virales.

3.4.2- Prélèvement des cellules spléniques et isolement des cellules lymphocytaires

Les souris ont été euthanasiées et aspergées à l'éthanol 70%. La rate a été extraite et broyée sur un filtre cellulaire à pores de 70µm (Falcon, Fisher Scientific Co.). Le filtre a été rincé avec 5mL de milieu complet contenant 20% de SVF (Hyclone Laboratories). Le filtrat a été recueilli et déposé sur un coussin de 5mL de Lymphoprep (Fisher Scientific, Montréal, Qc, Canada) dans un tube conique de 15mL, puis centrifugé à 600g durant 30 minutes à 4°C. Les cellules lymphocytaires, formant un anneau blanc à la surface du Lymphoprep, ont été recueillies et déposées dans 10mL de milieu complet contenant 20% de SVF (Hyclone Laboratories), puis centrifugées à 300g durant 10 minutes. Le culot cellulaire a été resuspendu à $3,3 \times 10^6$ cellules/mL (soit 1×10^6 cellules dans 300µL) dans du milieu complet contenant 10% de SVF (Hyclone Laboratories) pour la culture et les infections virales.

3.4.3- Culture des lymphocytes spléniques en contact direct avec des macrophages myéloïdes ou en godets (transwells)

Les macrophages myéloïdes ont été isolés par adhérence et cultivés dans des plaques de culture de 24 puits à une concentration cellulaire approximative de $0,5 \times 10^6$

cellules/puit. Ils ont été infectés et cultivés durant 24h à 37°C et 5% de CO₂ dans un volume de 700µL de milieu complet contenant 5% de SVF (Hyclone Laboratories). Un volume de 300µL de suspension cellulaire de lymphocytes spléniques à une concentration de $3,3 \times 10^6$ cellules/mL a été déposé directement dans les puits contenant les macrophages ou dans des godets couvert d'une membrane de polyester avec des pores de 0,4µm (Corning Life Sciences, Lowell, MA, USA) dans lesquels seul le milieu de culture des lymphocytes est en contact avec le milieu de culture des macrophages. Les lymphocytes ont été récupérés 24 heures plus tard afin d'effectuer les test d'apoptose et de métabolisme.

3.4.4- Isolement des microvaisseaux cérébraux

Les cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux ont été isolées selon la méthode décrite par Munzenmaier et Harder, avec quelques modifications (Munzenmaier et Harder, 2000). Les souris ont été euthanasiées et aspergées d'éthanol à 70%. Le cerveau a été extrait et découpé grossièrement puis homogénéisé au « potter » dans du milieu complet contenant 10% de SVF (Hyclone Laboratories). L'homogénat a été centrifugé à 1000g durant 10 minutes à 4°C. Le culot a été re-suspendu dans une solution composée à 15% de dextran de *Leuconostoc mesenteroides* (Sigma-Aldrich, Montréal, Qc, Canada) dans du PBS à pH 7,2 (Gibco Laboratories) et centrifugé à 5000g durant 20 minutes à 4°C. Le culot a été suspendu une seconde fois dans la solution de dextran 15% et centrifugé à nouveau afin d'éliminer le maximum de myéline. Le culot a ensuite été suspendu dans du PBS à pH 7,2 (Gibco Laboratories) et la suspension a été passée à travers une colonne composée de billes de borosilicate de 1mm de diamètre (Chemglass, Vineland, NJ, USA). La colonne a ensuite été rincée avec 100mL de PBS (Gibco Laboratories). Les microvaisseaux adhérant aux billes ont par la suite été séparés par un brassage vigoureux des billes dans un tube contenant du PBS (Gibco Laboratories), et la suspension de microvaisseaux a été centrifugée à 1000g durant 10 minutes à 4°C.

3.4.5- Culture des cellules endothéliales cérébrales

Le culot de microvaisseaux a été resuspendu dans une solution de collagénase-II (500 μ g/mL) (Sigma Aldrich) dans du milieu complet contenant 10% de SVF (Hyclone Laboratories). La suspension de microvaisseaux a été incubée durant 10 min à 37°C dans un bain agitateur puis centrifugée à 1000g durant 10 min à 4°C. Le culot cellulaire a été resuspendu dans 10mL de milieu Ham's F-10 (Gibco Laboratories) contenant 10% de SVF (Hyclone Laboratories) et additionné de pénicilline (100U/mL), de streptomycine (100 μ g/mL), de L-glutamine (2mM) et de 2- β -mercaptoéthanol (10⁻⁵M) (Gibco Laboratories) et les microvaisseaux ont été mis en culture à 37°C et 5% de CO₂ dans un flacon T-25 à surface CellBIND™ (Corning Life Sciences). Après 3 jours de culture, le milieu a été remplacé par du milieu EGM®-2 (endothelial growth medium) (Clonetics, Lonza, Walkersville, MD, USA). À l'atteinte de la confluence, les cellules ont été divisées en trois par addition de trypsine (Gibco Laboratories) et la culture a été poursuivie dans des flacons T-75 à surface CellBIND™ (Corning Life Sciences). Les cellules ont subi un maximum de 3 passages avant d'être utilisées pour les expériences.

3.5- Lignées cellulaires

3.5.1- Cellules L2

Les cellules L2, une lignée continue de fibroblastes murins, ont été cultivées dans du milieu complet contenant 5% de SVF (Hyclone Laboratories). Elles ont été divisées à la trypsine (Gibco Laboratories). Les cellules L2 ont été utilisées pour propager et titrer les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59.

3.6- Infections virales

Les cellules endothéliales cérébrales ou les macrophages de moelle osseuse en culture dans des plaques de culture de 24 puits ou sur des lames en Permax pour microscope avec réservoirs (Lab-Teks®, Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA), selon les expériences, ont été infectées à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1 avec les variants L2-MHV3, C43-MHV3 ou MHV-A59. Les virus ont été mis en contact avec les cellules endothéliales cérébrales ou les macrophages de moelle osseuse

dans un volume minimal de milieu de culture EGM®-2 (Clonetics) ou de milieu complet, respectivement. Après 1h d'incubation à 37°C et 5% de CO₂, le milieu de culture contenant le virus a été retiré et remplacé par un volume de 1mL de milieu de culture EGM®-2 (Clonetics) pour les cellules endothéliales cérébrales ou de milieu complet contenant 5% de SVF (Hyclone Laboratories) pour les macrophages myéloïdes. La présence d'un effet cytopathique a été notée tout au long des infections. Selon les expériences, des prélèvements de surnageants ont été effectués à différents temps d'infection.

3.7- Traitement des cellules endothéliales avec du TNF- α

Pour les expériences avec ajout de TNF- α , les cellules endothéliales cérébrales infectées ont été cultivées dans des plaques de culture de 24 puits, à 37°C et 5% de CO₂ dans 1mL de milieu EGM®-2 (Clonetics) contenant du TNF- α murin recombinant (Biosource, Invitrogen, Burlington, Ont, Canada) à des concentrations de 0 à 100 ng/mL. Les surnageants ont été prélevés après 24h pour les dosages d'IL-6 et de PGE₂.

3.8- Traitements avec de l'héparine, un inhibiteur de TLR2 et un anticorps

AgB10

Les cellules endothéliales cérébrales ou les macrophages de moelle osseuse en culture dans des plaques de culture de 24 puits ont été incubés dans 1mL de milieu EGM®-2 (Clonetics) ou de milieu complet, respectivement, contenant de l'héparine (400U) (Sigma-Aldrich), un anticorps anti-TLR2 humain/murin (0,5 μ g) (clone T2.5, eBioscience, San Diego, CA, USA) ou un anticorps anti-CEACAM-1a AgB10 (macrophages seulement). L'anticorps AgB10 a été gracieusement fourni par le Dre Nicole Beauchemin (Centre de Recherche sur le Cancer, Université McGill, Montréal, Qc, Canada) et a été utilisé à une concentration de 3 μ g/mL. Après 1h d'incubation à 37°C et 5% de CO₂, le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été infectées par les différents virus. Les surnageants de cellules endothéliales ont été prélevés après 12h ou 24h p.i. et les surnageants de macrophages myéloïdes ont été prélevés à 24h p.i. pour les dosages de cytokines.

3.9- Évaluation du métabolisme cellulaire MTS/PMS

Le métabolisme cellulaire des lymphocytes spléniques ayant été en contact direct avec des macrophages syngéniques infectés ou en contact indirect via le surnageant par les godets a été quantifié par le niveau de l'activité des déshydrogénases mitochondriales. Les lymphocytes ont été recueillis après 24h de contact direct ou indirect avec les macrophages et incubés durant 12h en présence de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium / phénazine méthosulfate (MTS/PMS) (Promega Biosciences, San Luis Obispo, CA, USA). La densité optique à 490nm a ensuite été mesurée comme indicateur du métabolisme cellulaire.

3.10- Doubles immunomarquages et analyses cytofluorométriques

3.10.1- Mesure de l'apoptose des lymphocytes spléniques

L'apoptose a été évaluée sur les lymphocytes incubés durant 24h en contact direct avec des macrophages syngéniques ou séparés par les godets couvert d'une membrane de polyester avec des pores de 0,4µm (Corning Life Sciences) par la méthode commerciale d'immunomarquage Annexin-V-FLUOS (Roche Diagnostics, Laval, Qc, Canada). Les niveaux de fluorescence ont été acquis par cytofluorométrie sur un appareil FacScan (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA) et l'analyse des données a été réalisée avec le programme Cell Quest (Becton-Dickinson).

3.10.2- Phénotypage des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales à confluence ont été décollées à la trypsine (Gibco Laboratories) puis centrifugées à 550g durant 10 min à 4°C. Le culot cellulaire a été resuspendu dans du milieu de culture EGM®-2 (Clonetics) et un décompte cellulaire a été réalisé à l'hémacytomètre. La concentration cellulaire a été ajustée à 1×10^6 cellules/mL et les immunomarquages ont été réalisés sur 1×10^6 cellules dans un volume final de 1mL de milieu. Les cellules ont été incubées dans des cryovials durant 30 minutes sur glace à la noirceur avec 2µg/mL de la lectine de *Bandeira simplicifolia* couplée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Sigma-Aldrich), 5µg/mL d'anticorps anti-ICAM-1 murin couplés à la phycoérythrine (PE) (Clone 3E2, BD

Biosciences, Mississauga, On, Canada), 5µg/mL d'anticorps anti-PECAM-1 murin couplés à la PE (Clone MEC13.3, BD Biosciences) ou 2µg/mL d'anticorps anti-VCAM-1 couplés au FITC (Clone 429, BD Biosciences). Suite à l'incubation, les cryovials ont été centrifugés 1 minute à 3000g et les culots ont été suspendus dans 500µL de formaldéhyde 1% dans du PBS (Fisher Scientific, Montréal, Qc, Canada) puis gardés à 4°C pendant au moins 24h. Les niveaux de fluorescence ont été acquis sur un FacScan (Becton-Dickinson) puis l'analyse des données a été réalisée avec le programme Cell Quest.

3.11- Microscopie confocale

3.11.1- Culture et infection des cellules

Les macrophages isolés de la moelle osseuse de souris C57BL/6, SJL et *Ceacam-1a-/-* ont été cultivés à une concentration cellulaire de $0,5 \times 10^6$ cellules par chambre dans des Lab-Teks® à deux chambres sur lames en Permanox (Nalge Nunc International) dont le fond a été prétraité avec une solution de poly-L-lysine à 0,01% (Sigma-Aldrich). Les macrophages ont été infectés par les virus L2-MHV3 ou C43-MHV3. Après 24h, des lymphocytes spléniques syngéniques ont été ajoutés dans les chambres à une concentration de 1×10^6 cellules par chambre. Les cellules ont été incubées pour une autre période de 24h, puis le milieu de culture a été retiré. Les cellules ont ensuite été fixées, immunomarquées et observées au microscope confocal, tel qu'indiqué ci-après.

3.11.2- Fixation des cellules, immunomarquages et observation au microscope confocal

Les cellules adhérees aux lames des Lab-Teks® ont été fixées par l'immersion des lames dans une solution de PBS avec 4% de formaldéhyde (Fisher Scientific) durant 45 minutes avec une légère agitation. Les cellules fixées ont été incubées durant 30 minutes à la température de la pièce avec 200µL par lame (100µL par chambre) de PBS (Gibco Laboratories) contenant 10% de SVF (Hyclone Laboratories) afin de bloquer les sites non-spécifiques. Les lames ont ensuite été rincées dans une solution de PBS (Gibco Laboratories). Un volume de 200µL par lame d'anticorps polyclonal de

souris anti-MHV3 dilué 1/10 a été ajouté. Les lames ont ensuite été recouvertes d'une lamelle et incubées durant 30 minutes à la température de la pièce dans l'obscurité. L'excès d'anticorps a été éliminé par rinçage dans une solution de PBS (Gibco Laboratories). Suite au lavage, un anticorps anti-IgG de souris couplé au Cy3 (Sigma-Aldrich) et dilué 1/100 dans un volume de 200µL de PBS par lame a été ajouté. Les lames ont été incubées et lavées tel qu'indiqué précédemment. Les anticorps anti-CD11b couplé au FITC (2µg/chambre) (Clone M1/70, BD Biosciences) et anti-IgM couplé au PerCP-Cy5.5 (2µg/chambre) (Clone R6-60.2, BD Biosciences), anti-TCRβ couplé au PE-Cy5 (2µg/chambre) (Clone H57-597, BD Biosciences) ou anti-NK1.1 couplé au PerCP-Cy5.5 (2µg/chambre) (Clone PK136, BD Biosciences) ont ensuite été ajoutés simultanément dans un volume de 100µL de PBS par chambre. Les lames ont été incubées et lavées tel qu'indiqué précédemment. Les lames ont ensuite été asséchées délicatement et préparées pour l'observation en microscopie confocale par l'ajout d'une goutte de glycérol et d'une lamelle de verre d'épaisseur no. 0.

3.12- Quantification de la production de cytokines dans les surnageants de culture

Les concentrations de TNF-α, d'IL-6, d'IL-10, d'IL-12 (BD Biosciences) et de PGE₂ (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) dans les surnageants ont été déterminées par des tests ELISA commerciaux selon un protocole standardisé et ont été analysées à l'aide du programme Softmax.

3.13- Analyses statistiques

Les expériences *in vitro* sur les cellules endothéliales, les macrophages et les lymphocytes ont été réalisées en triplicata de puits cellulaires, et la concentration de cytokines dans les surnageants de chaque puit cellulaire a été dosée en duplicata par ELISA. Les concentrations de cytokines produites par les cellules infectées et/ou traitées ont été comparées à celles des cellules contrôles (non-infectées et/ou non-traitées) par un test t de Student paramétrique de type bilatéral par paires. Le seuil de signification a été établi à $p < 0,05$.

4- RÉSULTATS

4.1- Cellules endothéliales

4.1.1- Production des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux

Dans un premier temps, nous avons mis au point la méthode d'isolement et de culture des cellules endothéliales à partir de microvaisseaux cérébraux de souris C57BL/6. Une fois mises en culture, les cellules ont été observées régulièrement par microscopie à contraste de phase jusqu'à la confluence. Ainsi, les microvaisseaux, partiellement digérés à la collagénase avaient l'apparence de courts fragments, la plupart étant ramifiés. Il n'y avait que peu de cellules libres en culture. Après 3 jours d'incubation, la plupart des microvaisseaux avaient adhéré à la surface du flacon par une de leurs extrémités ouvertes. Des cellules adhérentes avaient commencé également à se développer autour du site d'attachement du microvaisseau. Les microvaisseaux qui n'avaient pas adhéré et des débris cellulaires en suspension ont alors été éliminés par le changement du milieu de culture. Après 9 à 12 jours d'incubation, les microvaisseaux adhérents ont laissé la place à des cellules proliférant en foyers là où les microvaisseaux s'étaient initialement attachés à la surface du plateau. Ces cellules montraient une forme allongée et étaient alignées les unes aux autres, ce qui est une caractéristique reconnue des cellules endothéliales. Quelques cellules morphologiquement différentes, certaines plus arrondies et d'autres plus grosses et ramifiées, ont parfois été observées. La forme de ces cellules, telle qu'observée en microscopie à contraste de phase, suggérait qu'elles pouvaient être des péricytes ou des cellules gliales résiduelles. La confluence des cellules endothéliales a été atteinte après 25 à 30 jours de culture et les cellules s'alignaient sur un même axe à mesure qu'elles proliféraient jusqu'à l'atteinte de la confluence. Ces cellules ont été trypsinées et mises en culture de une à trois fois et elles ont conservé leur morphologie et leur arrangement, bien que dès le premier passage elles avaient tendance à perdre leur alignement les unes aux autres et qu'au troisième passage elles étaient un peu moins allongées. Au quatrième passage, ces cellules devenaient plus arrondies, moins allongées et leur croissance était plus rapide, probablement à la suite du phénomène de différenciation et de la sélection des clones les plus prolifères. Pour nos expériences, les cellules utilisées provenaient seulement des trois premiers passages suite à la mise en culture des microvaisseaux cérébraux.

4.1.2- Caractérisation phénotypique des cellules endothéliales en culture *in vitro*

La nature des cellules cérébrales de souris C57BL/6, isolées et mises en culture, a été déterminée par la présence ou non des marqueurs PECAM-1 (CD31), ICAM-1 (CD54), V-CAM-1 (CD106) et par la fixation de la lectine de *Bandeira simplicifolia*. Pour ce faire, des cellules à confluence ont été immunomarquées avec des anticorps spécifiques ou la lectine et analysées en cytofluorométrie. Les résultats indiquent que près de 90% des cellules en culture ont fixé la lectine de *Bandeira simplicifolia* (Fig. 4A). Les marquages avec les anticorps dirigés contre le PECAM-1, l'ICAM-1 et le V-CAM ont révélé davantage d'hétérogénéité. Une proportion de 57% des cellules exprimaient le marqueur ICAM-1, 29% le PECAM-1 et 13% étaient positives pour le V-CAM-1 (Fig. 4B à D).

4.1.3- Permissivité des cellules endothéliales cérébrales de souris C57BL/6 aux virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59

Afin de vérifier si les cellules endothéliales cérébrales supportaient la réplication des virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59, des cellules endothéliales de souris C57BL/6 ont été mises en culture et infectées à une multiplicité d'infection (m.o.i.) de 0,01 à 0,1 avec chacun des 3 virus. Après différents temps d'infection, les surnageants de culture ont été prélevés et la production de virus infectieux a été évaluée par titrage selon la méthode des dilutions limites. Tel que montré à la figure 5, les cellules endothéliales cérébrales de souris C57BL/6 ont supporté la réplication des virus L2-MHV3 et C43-MHV3, mais pas celle du virus MHV-A59. En effet, le virus L2-MHV3 s'est répliqué dans ces cellules à un titre oscillant entre 10^4 et 10^5 DICT₅₀/ml selon le temps. Le virus C43-MHV3 s'est également efficacement répliqué, mais à des titres un peu plus faibles (10^3 à 10^4 DICT₅₀/ml), alors que la réplication du virus MHV-A59 est demeurée indétectable pour toute la durée de l'expérience.

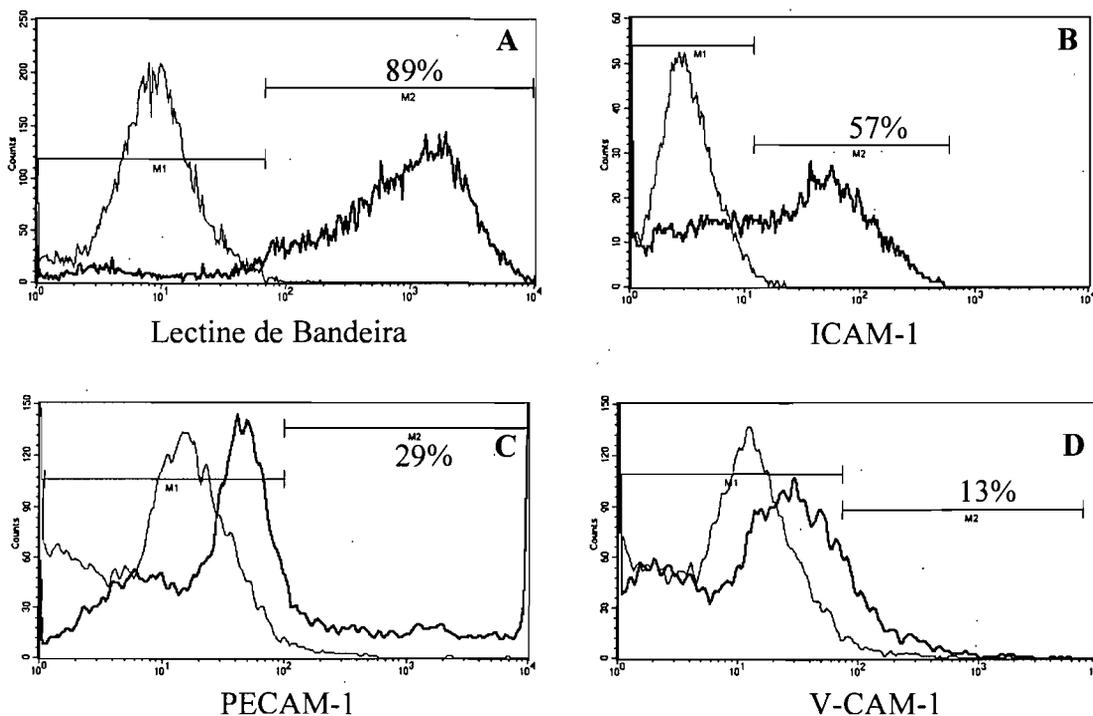


Figure 4. Caractérisation des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris C57BL/6.

Les cellules cultivées *in vitro* ont été marquées avec la lectine *Bandeira simplicifolia* couplée au FITC (89%) (A) ou avec des anticorps dirigés contre la molécule ICAM-1, couplés au PE (57%) (B), la molécule PECAM-1, couplés au PE (29%) (C) ou la molécule V-CAM-1, couplés au FITC (13%) (D). La figure représente l'analyse cytofluorométrique des cellules non-marquées (ligne mince) et des cellules marquées (ligne grasse). Le pourcentage de cellules positives pour un marqueur donné correspond au pourcentage de cellules marquées contenues dans l'intervalle M2. Les résultats sont représentatifs de 3 cultures différentes de cellules endothéliales.

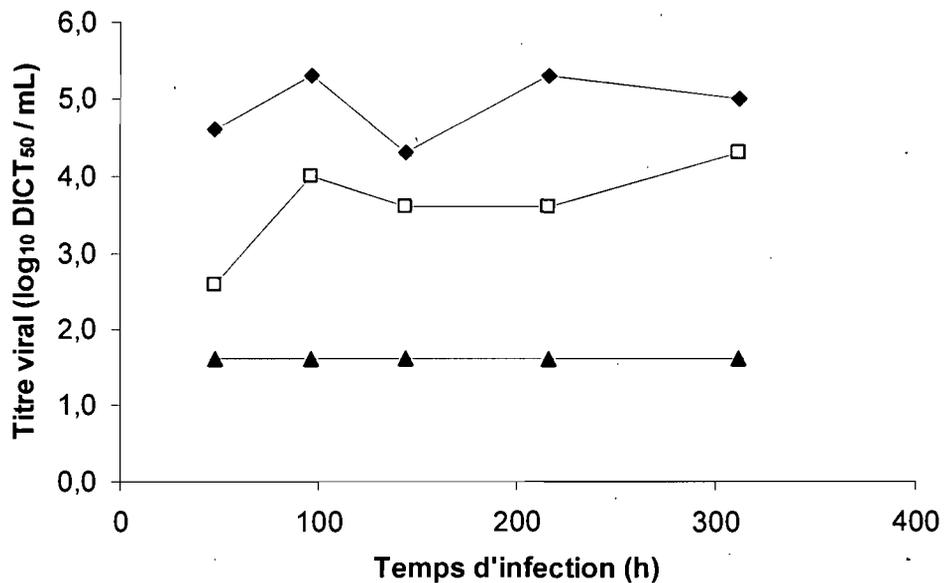


Figure 5. Production de virus infectieux par les cellules endothéliales de souris C57BL/6.

Les titres viraux dans les surnageants de cellules endothéliales infectées ont été mesurés à différents temps d'infection avec les virus L2-MHV3 (◆), C43-MHV3 (□) ou MHV-A59 (▲) par un test de dilution limite sur cellules L2. Les résultats sont représentatifs de trois expériences différentes. La limite de détection du test est de 1,6 log₁₀ DICT₅₀/mL.

4.1.4- Effets des infections virales sur la production de cytokines par les cellules endothéliales de souris C57BL/6

4.1.4.1- Production d'interféron alpha (IFN- α)

Afin de déterminer si la différence dans les niveaux de replication virale chez les cellules endothéliales cérébrales de souris C57BL/6 infectées avec les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 résultaient de la production ou non d'IFN- α selon les virus, les concentrations d'IFN- α ont été mesurées dans les surnageants de cellules endothéliales cérébrales infectées *in vitro* par les virus à différents temps d'infection. Le virus L2-MHV3, dont les titres viraux dans le surnageant des cellules endothéliales étaient plus élevés que ceux des deux autres virus, n'a engendré aucune augmentation significative de la concentration d'IFN- α dans le surnageant de cellules endothéliales infectées (Fig. 6A). Malgré le faible niveau de production d'IFN- α par les cellules endothéliales de souris C57BL/6, l'infection par le virus C43-MHV3 a entraîné une augmentation significative de la production d'IFN- α à 48h et à 144h d'infection (Fig. 6B) ($p < 0,05$), alors que le virus MHV-A59 a entraîné une augmentation significative de la production d'IFN- α par les cellules endothéliales après 216h et 312h d'infection seulement (Fig. 6C) ($p < 0,05$).

4.1.4.2- Production d'interleukine-6 (IL-6)

Les cellules endothéliales ont la capacité de produire des cytokines inflammatoires, dont l'IL-6. La production de cette cytokine a alors été vérifiée durant l'infection induite par les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59. Tel que montré à la figure 7, les cellules endothéliales non-infectées de souris C57BL/6 ont produit de l'IL-6, mais cette production a montré une tendance à la baisse en fonction du temps de culture des cellules. Suite à l'infection *in vitro* par le virus L2-MHV3, une baisse importante d'IL-6 a été remarquée dès 44 heures d'infection, mais cette chute n'a été que temporaire, car la production d'IL-6 est ensuite revenue à un niveau similaire ou supérieur à ce qui était produit par les cellules non-infectées (Fig. 7A) ($p < 0,05$). Par contre, cette chute n'est pas apparue lorsque les cellules ont été infectées par le virus C43-MHV3. Au contraire, la présence du virus C43-MHV3 a fait augmenter la

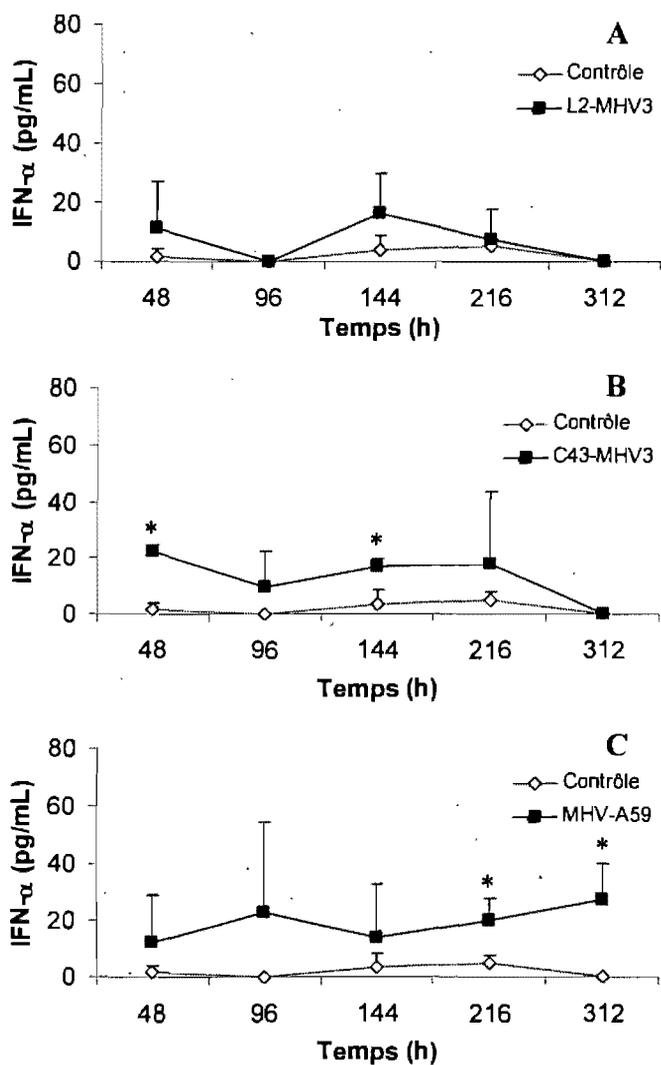


Figure 6. Production d'IFN- α par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris C57BL/6 infectées.

Les cellules endothéliales ont été infectées *in vitro* par les virus L2-MHV3 (A), C43-MHV3 (B) et MHV-A59 (C) avec des suspensions virales à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1. Les surnageants ont été récoltés à différents temps et l'IFN- α a été dosé par un test ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. * $p < 0,05$

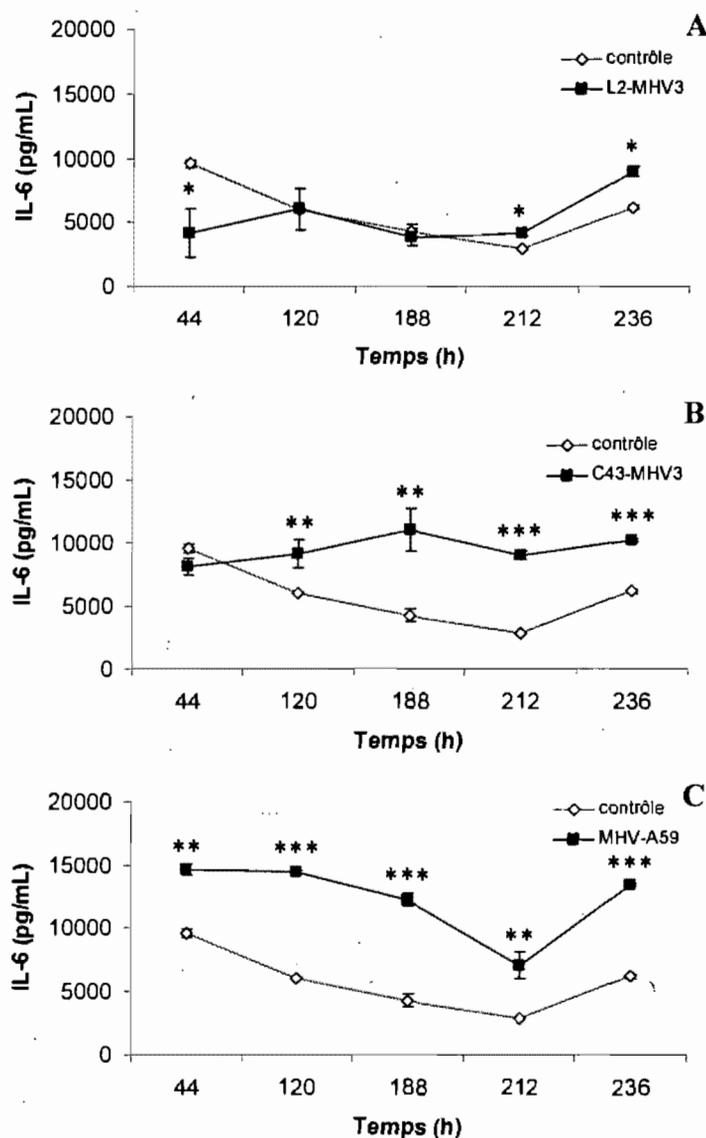


Figure 7. Production d'IL-6 par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris C57BL/6 infectées.

Les cellules endothéliales ont été infectées *in vitro* par les virus L2-MHV3 (A), C43-MHV3 (B) et MHV-A59 (C) avec des suspensions virales à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1. Les surnageants ont été récoltés à différents temps et l'IL-6 a été dosée par un test ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicate. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$

production d'IL-6 par les cellules endothéliales (Fig. 7B) ($p < 0,01$ à $0,005$). Finalement, le virus MHV-A59 a stimulé fortement la production d'IL-6 par les cellules endothéliales (Fig. 7C) ($p < 0,01$ à $0,005$).

4.1.4.3- Production de prostaglandine E₂ (PGE₂)

Il est connu que les cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux sont de fortes productrices de PGE₂ et que cette cytokine est impliquée dans le contrôle de la réponse inflammatoire dans le SNC (Minghetti *et al.*, 1998). La production de PGE₂ par les cellules endothéliales isolées à partir des microvaisseaux cérébraux a donc été mesurée par un test ELISA. Les cellules endothéliales non-infectées de souris C57BL/6 ont produit de la PGE₂ à 24h et 96h (Fig. 8A). Par contre, le niveau de production de PGE₂ par les cellules endothéliales a graduellement chuté jusqu'à 168 heures de culture (résultats non-montrés). L'infection des cellules endothéliales de souris C57BL/6 par les virus L2-MHV3 et C43-MHV3 a entraîné une diminution des niveaux de PGE₂ à 24h d'infection (Fig. 8A et B) ($p < 0,05$). Le virus L2-MHV3 a entraîné une diminution de PGE₂ d'environ 70% dans les surnageants de cellules endothéliales ($p < 0,05$). À 96h d'infection, le virus L2-MHV3 a engendré une inhibition de la production de PGE₂ d'environ 50% par rapport au contrôle ($p < 0,05$). Par contre, après 168 heures d'infection, les taux de PGE₂ détectés dans les surnageants des cellules endothéliales infectées par le L2-MHV3 et non-infectées étaient similaires (résultats non-montrés).

La production de PGE₂ dans les cellules endothéliales infectées par le virus C43-MHV3 a aussi été inhibée, mais moins fortement que dans le cas de l'infection avec le virus L2-MHV3. Tout comme pour le L2-MHV3, la diminution de PGE₂ dans les surnageants de cellules endothéliales infectées par le virus C43-MHV3 par rapport aux cellules non-infectées a été la plus forte dans les premières 24 heures et a atteint 60% (Fig. 8B) ($p < 0,05$). Après 96 heures d'infection, la baisse de PGE₂ n'était plus significative. Par contre, après 168 heures d'infection, la présence du virus C43-MHV3 a stimulé la production de PGE₂ par les cellules endothéliales, faisant doubler la quantité de PGE₂ accumulée dans les surnageants ($p < 0,01$) (résultats non-montrés).

Contrairement aux deux autres virus, le virus MHV-A59 n'a eu que peu d'effet

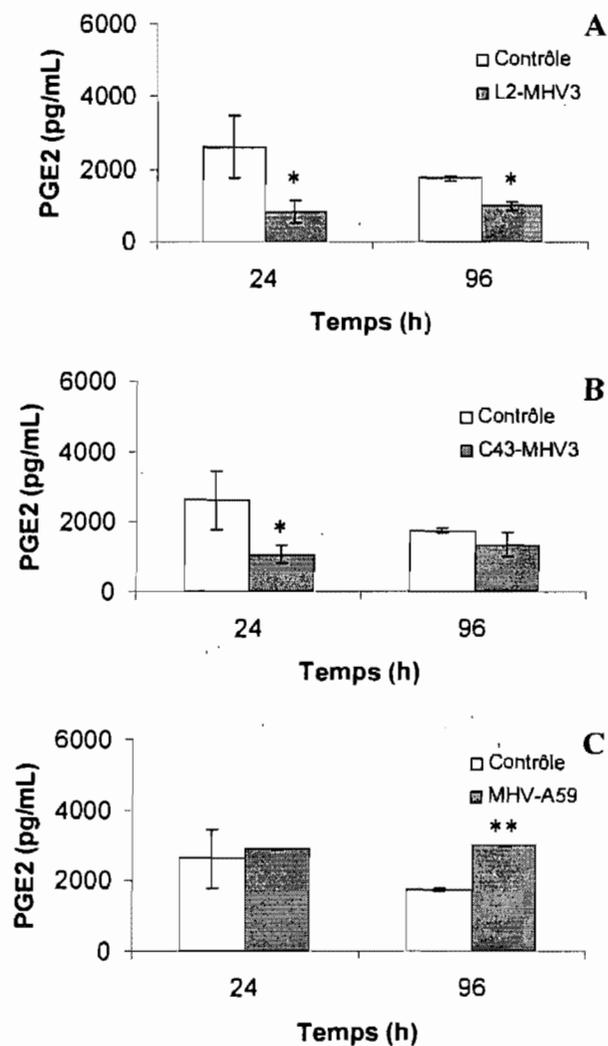


Figure 8. Production de PGE₂ par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris C57BL/6 infectées.

Les cellules endothéliales ont été infectées *in vitro* par les virus L2-MHV3 (A), C43-MHV3 (B) et MHV-A59 (C) avec des suspensions virales à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1. Les surnageants ont été récoltés à différents temps et la PGE₂ a été dosée par un test ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. *p<0,05 **p<0,01

sur la production de PGE₂ par les cellules endothéliales après 24 heures d'infection (Fig. 8C). Par contre, le virus MHV-A59 a stimulé significativement la production de PGE₂ chez les cellules endothéliales de souris C57BL/6 au 4^e jour d'infection *in vitro*, faisant presque doubler le niveau de PGE₂ retrouvé dans le surnageant (Fig. 8C) ($p < 0,01$).

4.1.4.4- Production d'interleukine-10 (IL-10)

L'IL-10 est une cytokine jouant un rôle important dans le maintien de la tolérance immunologique du cerveau (Vitkovic *et al.*, 2001). Afin de vérifier si la production d'IL-10 pouvait être altérée suite à l'infection des cellules endothéliales de souris C57BL/6 par les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59, la concentration d'IL-10 a été mesurée à différents temps dans les surnageants de cellules endothéliales cérébrales infectées par ces virus. Les résultats montrent que les cellules endothéliales de souris C57BL/6 non-infectées ne sécrétaient que peu ou pas d'IL-10. Les infections *in vitro* jusqu'à environ 13 jours par les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 n'ont pas augmenté la production d'IL-10 (Fig. 9A à C). Par contre, une augmentation transitoire de la concentration d'IL-10 dans le surnageant de cellules endothéliales a été observée après 144h d'infection par le MHV-A59 (Fig. 9C) ($p < 0,05$).

4.1.5- Permissivité des cellules endothéliales cérébrales de souris SJL aux virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59

La capacité des cellules endothéliales cérébrales de souris SJL, lignée murine semi-susceptible, à supporter la réplication des virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 a été évaluée de la même manière que pour les souris C57BL/6 (Section 4.1.3). La production de virions infectieux par les trois virus étudiés est demeurée sous la limite de détection du test pour toute la durée de l'expérience (résultats non-montrés).

4.1.6- Effets des infections virales sur la production de cytokines par les cellules endothéliales de souris SJL

Afin de déterminer si l'induction ou non des cytokines par les cellules endothéliales nécessitait la fixation du virus au récepteur CEACAM-1a et la réplication

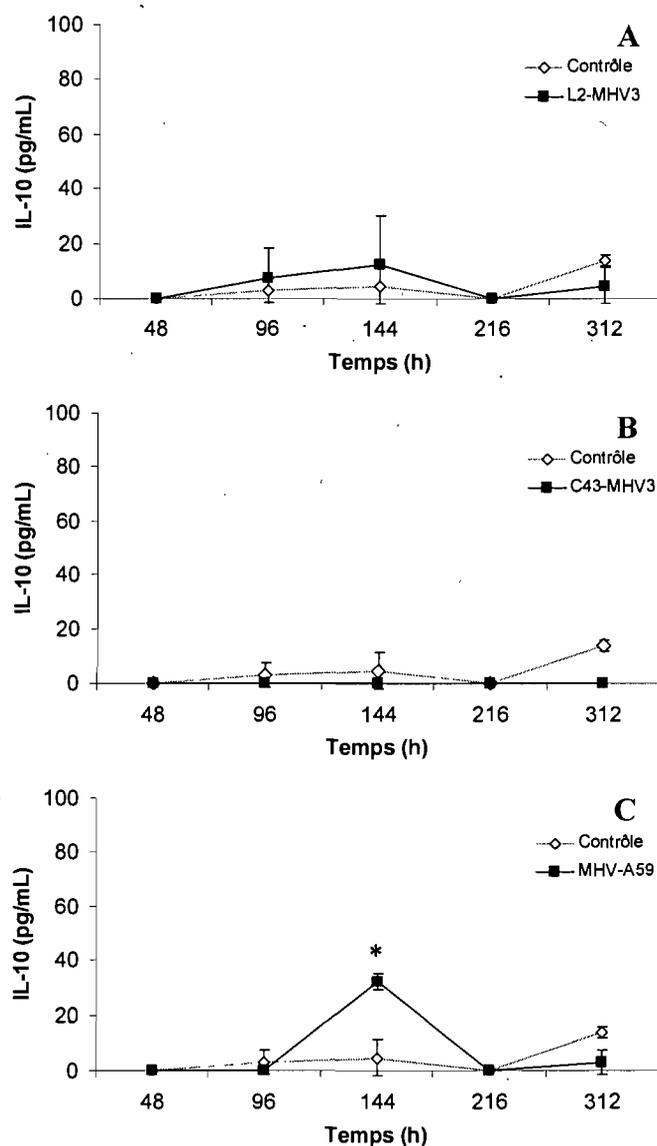


Figure 9. Production d'IL-10 par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris C57BL/6 infectées.

Les cellules endothéliales ont été infectées *in vitro* par les virus L2-MHV3 (A), C43-MHV3 (B) et MHV-A59 (C) avec des suspensions virales à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1. Les surnageants ont été récoltés à différents temps et l'IL-10 a été dosée par un test ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. * $p < 0,05$

virale, des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux provenant de la souche de souris SJL exprimant l'allèle 1b de la molécule CEACAM-1 ont été isolées et infectées.

4.1.6.1- Production d'interféron alpha (IFN- α)

Pour vérifier si les cellules endothéliales de souris SJL pouvaient produire de l'IFN- α suite au contact avec les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59, ces cellules ont été infectées *in vitro* durant 24h et 96h et les concentrations d'IFN- α ont été mesurées dans les surnageants. Après 24h, aucune production d'IFN- α n'a été détectée dans les surnageants de cellules non-infectées et aucun des trois virus n'a stimulé cette production (Fig. 10A). Après 96h de culture, la production basale d'IFN- α observée dans les surnageants de cellules non-infectées s'est accrue, potentiellement à cause de la présence des protéines cellulaires exogènes provenant du surnageant de cellules L2 non-infectées, qui a été utilisé comme surnageant contrôle puisque les virus sont produits sur ces cellules. Cette sécrétion a toutefois été partiellement inhibée par les virus L2-MHV3 (inhibition de 15%) et MHV-A59 (inhibition de 64%) (Fig. 10A et C) ($p < 0,05$ à $0,01$) alors que le virus C43-MHV3 l'a inhibée totalement (Fig. 10B) ($p < 0,005$).

4.1.6.2- Production d'interleukine-6 (IL-6)

La production d'IL-6 des cellules endothéliales de souris SJL a aussi été vérifiée durant l'infection induite par les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59. Tel que montré à la figure 11, les cellules endothéliales de souris SJL non-infectées produisent de l'IL-6. Après 24h d'infection aucune variation significative de la production d'IL-6 n'a toutefois été induite par les trois virus en comparaison avec le contrôle. À 96h p.i., seul le virus C43-MHV3 a provoqué une variation dans la production d'IL-6. Ce virus a engendré une chute de 23% de la concentration d'IL-6 dans les surnageants de culture (Fig. 11B) ($p < 0,05$).

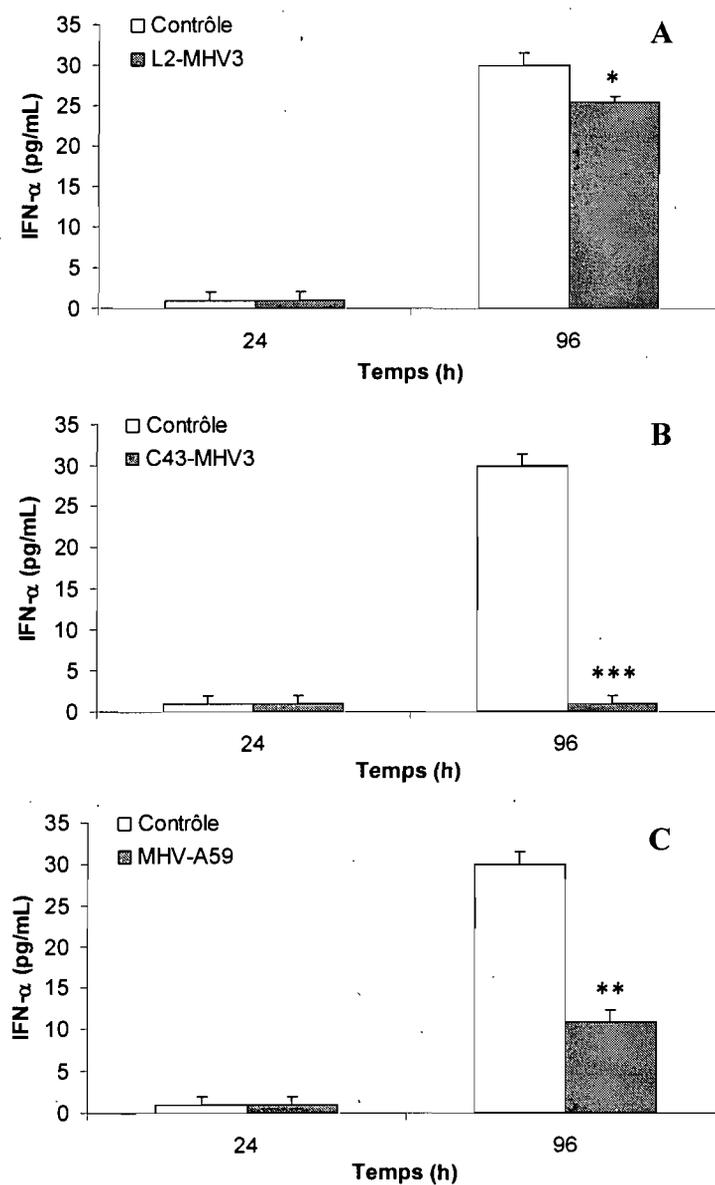


Figure 10. Production d'IFN- α par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris SJL infectées.

Les cellules endothéliales ont été infectées *in vitro* avec des suspensions virales de L2-MHV3 (A), de C43-MHV3 (B) ou de MHV-A59 (C), à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1. Les surnageants ont été récoltés à 24 et 96h et l'IFN- α a été dosée par un test ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$

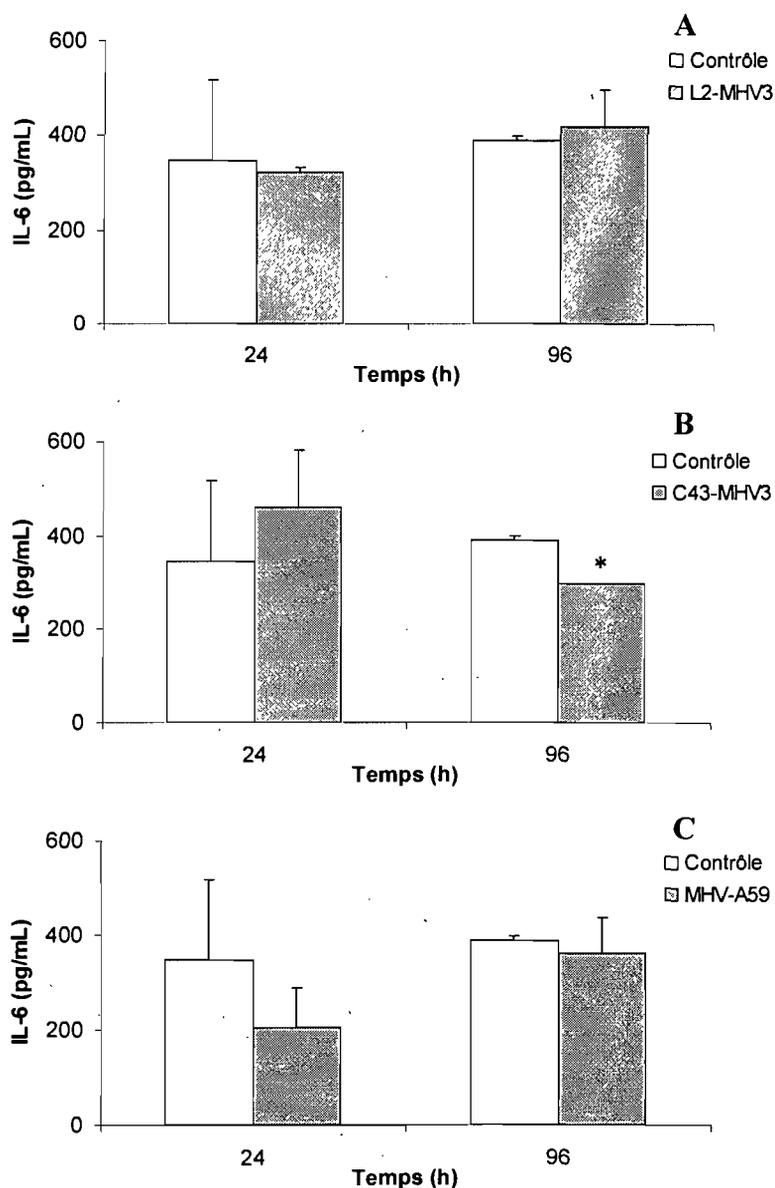


Figure 11. Production d'IL-6 par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris SJL infectées.

Les cellules endothéliales ont été infectées *in vitro* par les virus L2-MHV3 (A), C43-MHV3 (B) et MHV-A59 (C) avec des suspensions virales à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1. Les surnageants ont été récoltés après 24 et 96h d'infection et l'IL-6 a été dosée par un test ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. * $p < 0,05$

4.1.6.3- Production de prostaglandine E₂ (PGE₂)

Les niveaux de PGE₂ détectés dans les surnageants de cellules endothéliales de souris SJL non infectées ont été plus faibles que ceux retrouvés chez les cellules endothéliales de souris C57BL/6 en culture dans les mêmes conditions, toutefois la production de PGE₂ est demeurée plus stable dans le temps chez les cellules endothéliales de souris SJL. Suite aux infections avec les virus L2-MHV3, le C43-MHV3 ou le MHV-A59, peu ou pas d'effet n'ont été observés sur les niveaux de production de PGE₂ par les cellules endothéliales de souris SJL (Fig. 12A à C).

4.1.7- Permissivité des cellules endothéliales cérébrales de souris *Ceacam-1a*^{-/-} aux virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59

Les souris C57BL/6 « Knock Out » pour le gène *Ceacam-1a* n'expriment pas le récepteur spécifique des virus MHV. Afin de vérifier si les cellules endothéliales cérébrales de souris *Ceacam-1a*^{-/-} supportaient la réplication des virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59, des cellules endothéliales ont été mises en culture et infectées, les surnageants de culture ont été prélevés et la production de virus infectieux a été évaluée par titrage selon la méthode des dilutions limites. Tel que montré à la figure 13, les cellules endothéliales cérébrales de souris *Ceacam-1a*^{-/-} ont supporté la réplication des virus L2-MHV3 et C43-MHV3, mais à un titre inférieur à celui des cellules endothéliales de souris C57BL/6, alors qu'elles n'ont pas supporté la réplication du virus MHV-A59. Le virus C43-MHV3 a été détecté dans les surnageants de cellules endothéliales infectées à 96h et 168h, alors que le virus L2-MHV3 a été détecté seulement dans les surnageants de cellules endothéliales infectées après 120h.

4.1.8- Effets des infections virales sur la production de cytokines par les cellules endothéliales de souris *Ceacam-1a*^{-/-}.

L'évaluation de la production de cytokines par les cellules endothéliales cérébrales de souris *Ceacam-1a*^{-/-} en contact avec les trois virus étudiés a été réalisée dans le but d'établir si la production ou l'inhibition de cytokines par les cellules endothéliales de souris C57BL/6 en présence des différents virus était en relation avec la fixation du virus à son récepteur.

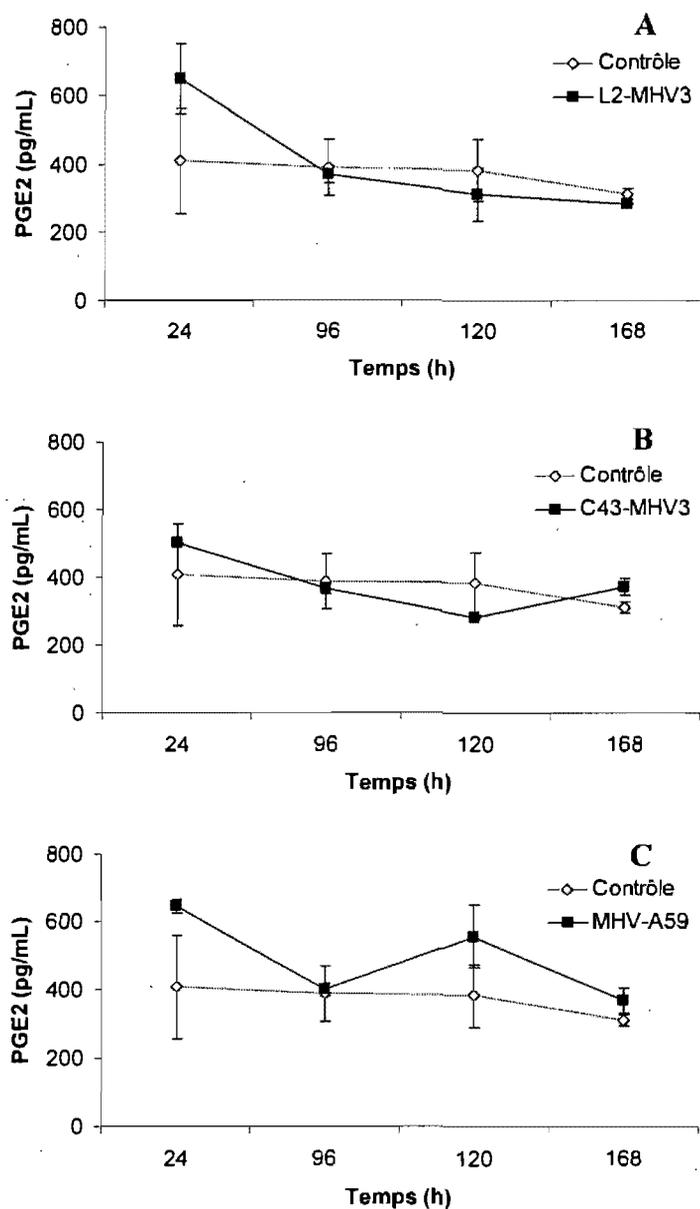


Figure 12. Production de PGE₂ par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris SJL infectées.

Les cellules endothéliales ont été infectées *in vitro* par les virus L2-MHV3 (A), C43-MHV3 (B) et MHV-A59 (C) avec des suspensions virales à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1. Les surnageants ont été récoltés après différents temps d'infection et la PGE₂ a été dosée par un test ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicate.

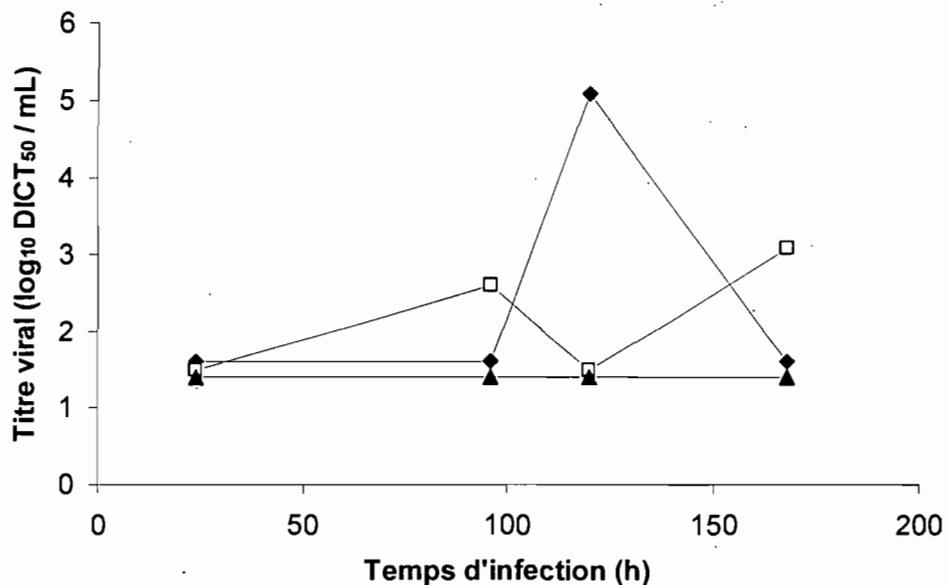


Figure 13. Production de virus infectieux par les cellules endothéliales de souris *Ceacam-1a-/-* infectées.

Les titres viraux dans les surnageants de cellules endothéliales ont été mesurés à différents temps d'infection avec les virus L2-MHV3 (◆), C43-MHV3 (□) ou MHV-A59 (▲) par un test de dilution limite sur cellules L2. Les résultats sont représentatifs de triplicata. La limite de détection du test est de 1,6 log₁₀ DICT₅₀/mL.

4.1.8.1- Production d'interféron alpha (IFN- α)

Afin de déterminer si la présence des virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 pouvait induire une sécrétion d'IFN- α chez les cellules endothéliales de souris *Ceacam-1a-/-*, les concentrations d'IFN- α ont été mesurées dans les surnageants de cellules après 24h et 96h en présence des virus. Aucune production d'IFN- α n'a été détecté à 24h et 96h p.i. autant chez les cellules infectées par chacun des trois virus que chez les cellules non-infectées (résultats non-montrés).

4.1.8.2- Production d'interleukine-6 (IL-6)

Les effets des virus étudiés sur la production d'IL-6 par les cellules endothéliales de souris *Ceacam-1a-/-* ont été évalués à 24h et 96h de culture. Tel que montré à la figure 14, les trois virus ont entraîné une chute de la production d'IL-6 par les cellules endothéliales à 24h et une chute encore plus importante à 96h p.i. ($p < 0,05$ à $0,01$). Le virus L2-MHV3 a engendré la chute la plus importante, soit de plus de 50% de la production d'IL-6 à 24h et 96h (Fig. 14A) ($p < 0,01$).

4.1.8.3- Production de prostaglandine E₂ (PGE₂)

Les cellules endothéliales de souris *Ceacam-1a-/-* ont produit des niveaux de PGE₂ plus élevés durant les 7 premiers jours de culture que les cellules endothéliales de souris C57BL/6 et SJL en culture dans les mêmes conditions. Similairement à ce qui a été observé avec les cellules endothéliales de souris C57BL/6, le niveau de production de PGE₂ par les cellules endothéliales de souris *Ceacam-1a-/-* a diminué avec le temps de culture (Fig. 15). L'infection *in vitro* des cellules endothéliales de souris *Ceacam-1a-/-* par les virus C43-MHV3 et MHV-A59 a entraîné une diminution des niveaux de PGE₂ détectés dans les surnageants jusqu'au 5^e jour d'infection ($p < 0,05$ à $0,005$) (Fig. 15B et C), alors que cette inhibition était non significative en présence des virus L2-MHV3 (Fig. 15A).

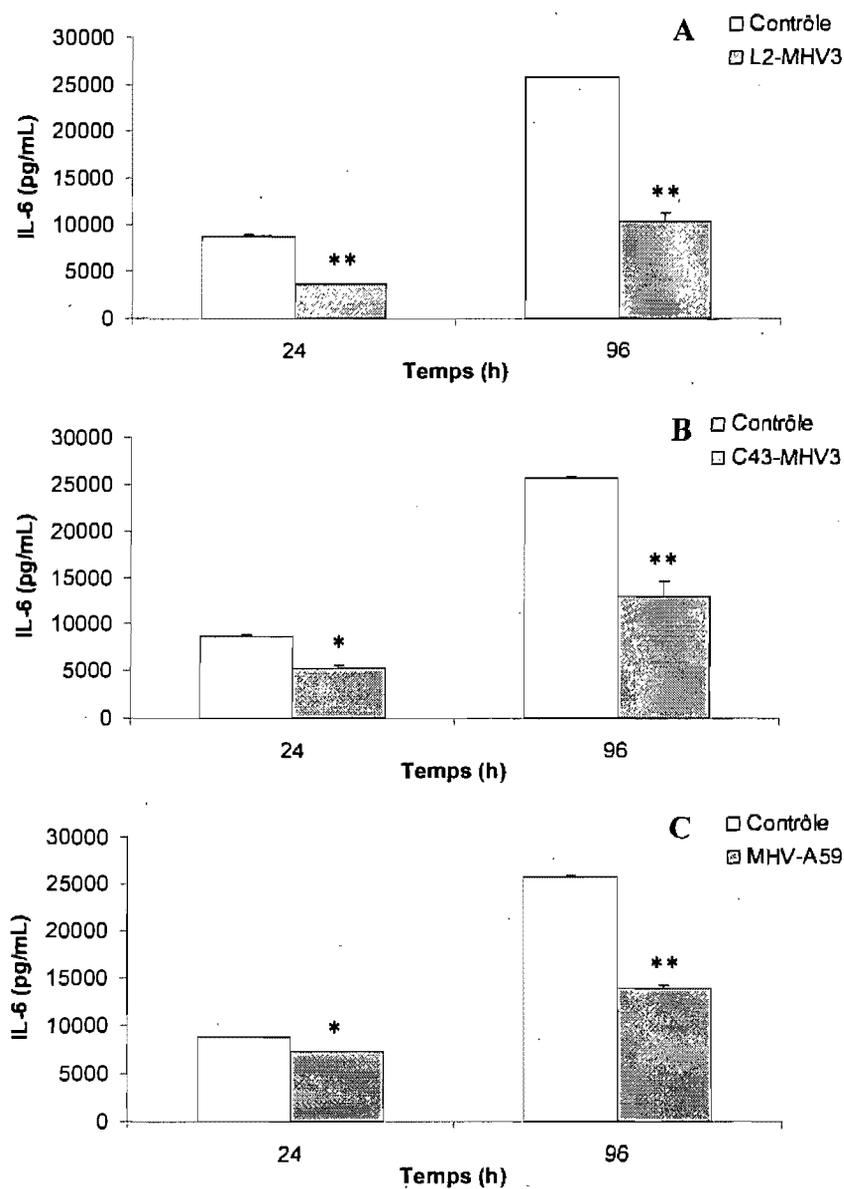


Figure 14. Production d'IL-6 par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris *Ceacam-1a*^{-/-} infectées.

Les cellules endothéliales ont été infectées *in vitro* par les virus L2-MHV3 (A), C43-MHV3 (B) et MHV-A59 (C) avec des suspensions virales à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1. Les surnageants ont été récoltés après 24 et 96h d'infection et l'IL-6 a été dosée par un test ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. * $p < 0,05$
** $p < 0,01$

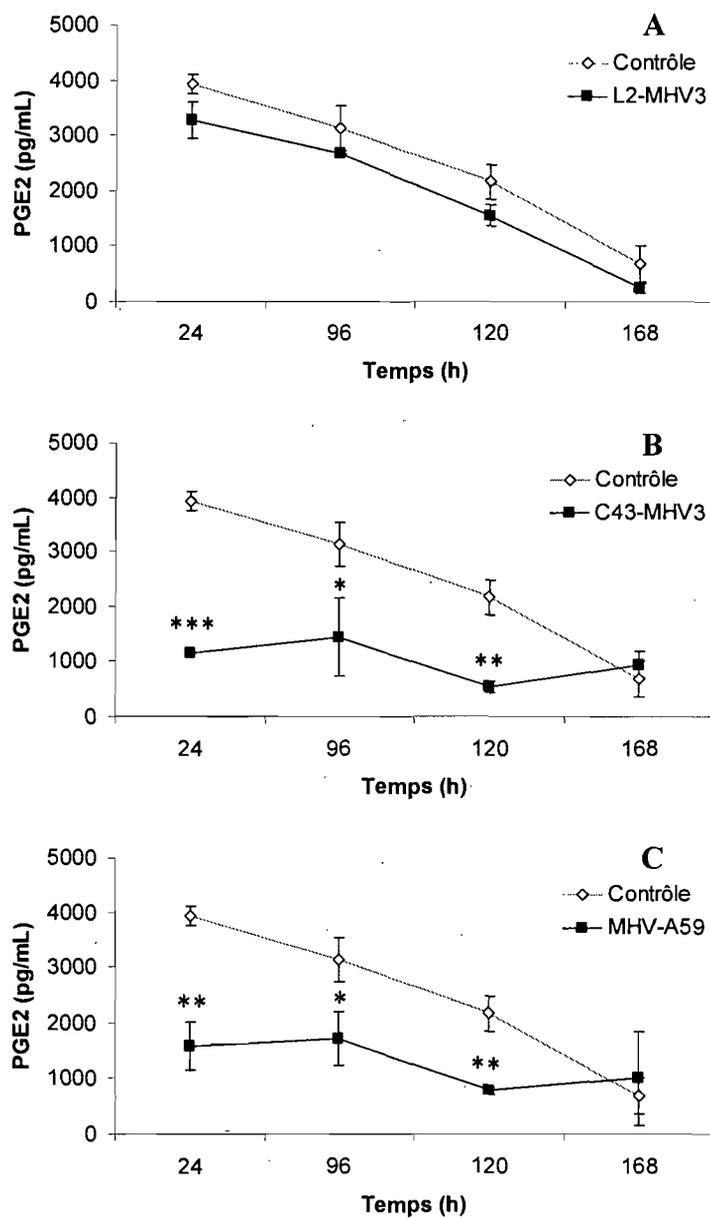


Figure 15. Production de PGE₂ par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris *Ceacam-1a*^{-/-} infectées.

Les cellules endothéliales ont été infectées *in vitro* par les virus L2-MHV3 (A), C43-MHV3 (B) et MHV-A59 (C) avec des suspensions virales à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1. Les surnageants ont été récoltés après 24, 96, 120 et 168h d'infection et la PGE₂ a été dosée par un test ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,005

4.1.9- Rôle des régions héparanes sulfates dans la production d'IL-6 par les cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris C57BL/6 infectées *in vitro* par les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59

La production d'IL-6 par les cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris C57BL/6 induite par les infections avec les virus C43-MHV3 et MHV-A59, mais plus faible avec le virus L2-MHV3, pourrait être due à l'activation des récepteurs héparanes sulfates. Cette hypothèse a été vérifiée en infectant les cellules endothéliales en présence d'héparine, un analogue soluble des récepteurs héparanes sulfates (de Haan *et al.*, 2005).

Dès 12h p.i., la production d'IL-6 par les cellules endothéliales en absence d'héparine a été stimulée par tous les virus, mais davantage par le C43-MHV3 que par les deux autres virus (Fig. 16A à C) ($p < 0,05$ à $0,01$). L'addition d'héparine a fortement inhibée la production basale d'IL-6 par les cellules endothéliales non infectées, mais aussi celles infectées avec chacun des trois virus étudiés ($p < 0,01$). La diminution de la production d'IL-6 a été comparable avec chacun des trois virus. Après 24h, la production d'IL-6 s'est avérée plus faible chez les cellules infectées avec le MHV-A59, mais l'effet inhibiteur de l'héparine s'est maintenu chez les cellules infectées par l'un ou l'autre des virus (Fig. 16D à F) ($p < 0,01$ à $0,005$). Par contre, l'héparine n'a pas complètement inhibé la production d'IL-6 puisque le niveau d'IL-6 est demeuré quand même légèrement plus élevé chez les cellules infectées que chez les cellules contrôles ($p < 0,05$).

4.1.10- Rôle du récepteur TLR2 dans la production d'IL-6 par les cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris C57BL/6

Les récepteurs TLR sont connus pour induire la production de cytokines inflammatoires dont l'IL-6. Comme les cellules endothéliales expriment le TLR2 et que ce récepteur peut être utilisé par certains virus, le rôle du TLR2 dans la production d'IL-6 par les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 a été vérifié. Les cellules endothéliales de souris C57BL/6 ont été infectées avec les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 en présence d'un inhibiteur du TLR2 et les niveaux d'IL-6 ont été mesurés après 12h et 24h p.i. Tel que montré dans la figure 17, l'ajout d'un inhibiteur

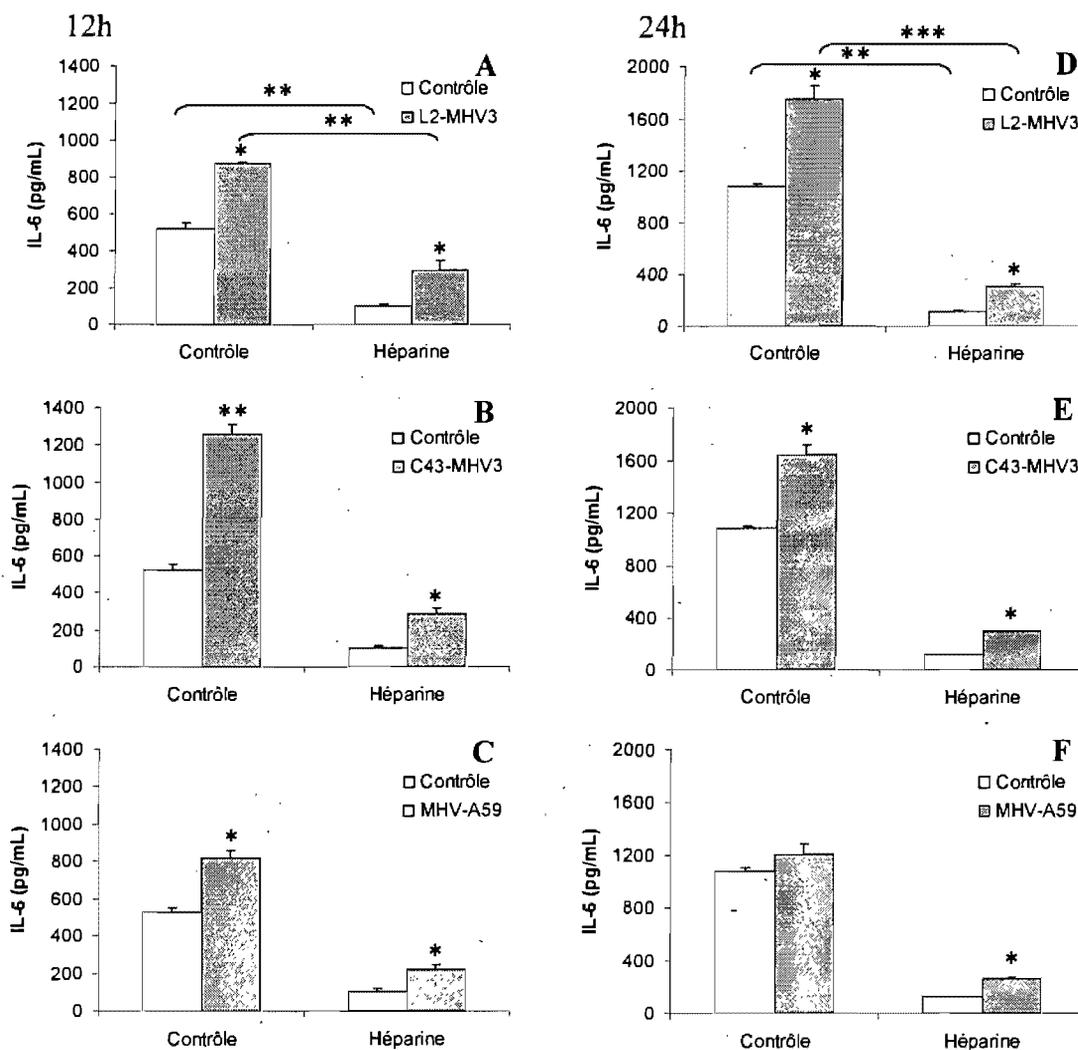


Figure 16. Effet de l'héparine sur la production d'IL-6 par les cellules endothéliales cérébrales de souris C57BL/6 infectées.

Les cellules ont été incubées avec l'héparine à une concentration de 400 U/mL durant 1h avant l'infection avec les suspensions virales de L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 à une multiplicité d'infection de 0.01 à 0.1. Les surnageants de cellules ont été récoltés après 12h (A à C) et 24h (D à F) d'infection et l'IL-6 a été dosée par un test ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$

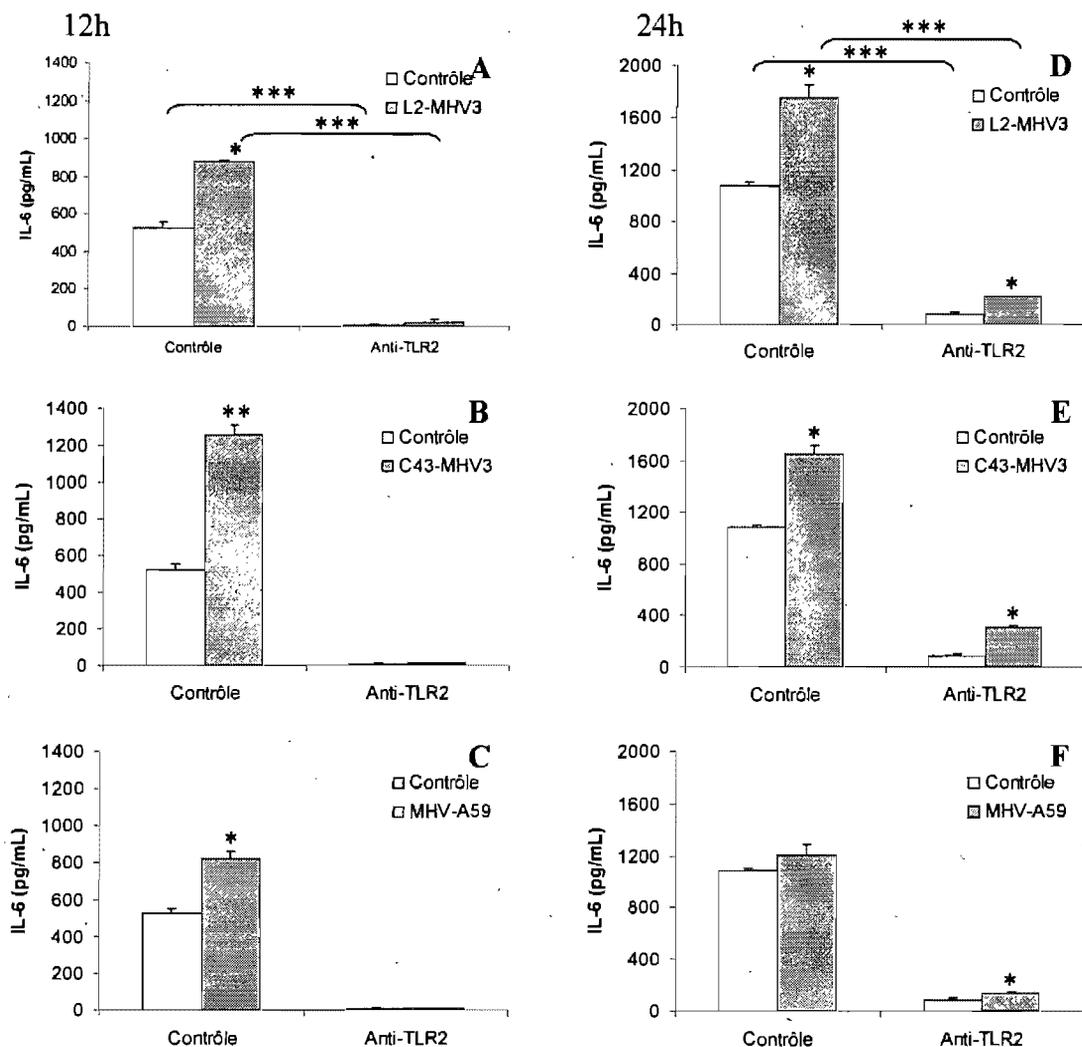


Figure 17. Effet d'un inhibiteur du TLR2 sur la production d'IL-6 par les cellules endothéliales cérébrales de souris C57BL/6 infectées.

Les cellules ont été incubées avec un inhibiteur du TLR2 à une concentration de 500 ng/mL durant 1h avant l'infection avec les suspensions virales de L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 à une multiplicité d'infection de 0.01 à 0.1. Les surnageants de cellules ont été récoltés après 12h (A à C) et 24h (D à F) d'infection et l'IL-6 a été dosée par un test ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$

du TLR2 a totalement bloqué la production basale d'IL-6 par les cellules endothéliales et celle des cellules infectées avec les trois virus après 12h ($p < 0.005$) (Fig. 17A à C). Par contre, cet effet a diminué après 24h (Fig. 17D à F), et les virus ont montré une capacité à induire un peu d'IL-6 même en présence de l'inhibiteur du TLR2 ($p < 0.05$).

4.1.11- Effets de l'ajout de TNF- α sur la production d'IL-6 et de PGE₂ par les cellules endothéliales cérébrales de souris C57BL/6

Le TNF- α est la principale cytokine produite par les macrophages périphériques en réponse à des dommages tissulaires ou à une infection (Konsman *et al.*, 2007). Comme l'infection *in vivo* par les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 peut entraîner la production de TNF- α par les monocytes/macrophages recrutés à la barrière hémato-encéphalique et que ce TNF- α sanguin peut influencer les fonctions des cellules endothéliales cérébrales (Trickler *et al.*, 2005), différentes concentrations de TNF- α (de 0 à 100 ng/mL) ont été ajoutées dans le milieu de culture des cellules endothéliales cérébrales infectées et cultivées *in vitro*. Les niveaux de production d'IL-6 et de PGE₂ ont alors été évalués par des tests ELISA.

4.1.11.1- L'IL-6

Tel que montré dans la figure 18A, l'addition de TNF- α a augmenté la production d'IL-6 par les cellules endothéliales non-infectées même à la concentration de 0.1 ng/mL ($p < 0,01$). L'addition de TNF- α a aussi augmenté la production d'IL-6 par les cellules infectées par tous les virus ($p < 0,01$), mais à un niveau comparable à celui des cellules non-infectées même si le virus L2-MHV3 avait déjà entraîné une légère hausse d'IL-6 ($p < 0,05$) (Fig. 18A à C).

4.1.11.2- La PGE₂

La PGE₂ étant une des cytokines les plus caractéristiques des cellules endothéliales cérébrales (Remoli *et al.*, 2002), les cellules endothéliales de souris C57BL/6 ont été infectées avec les trois virus, traitées avec différentes concentrations de TNF- α et la PGE₂ relâchée dans le surnageant a été dosée. Ainsi, le TNF- α a modulé la production de PGE₂ puisque, à une faible dose (0,1 ng/mL), il a diminué la

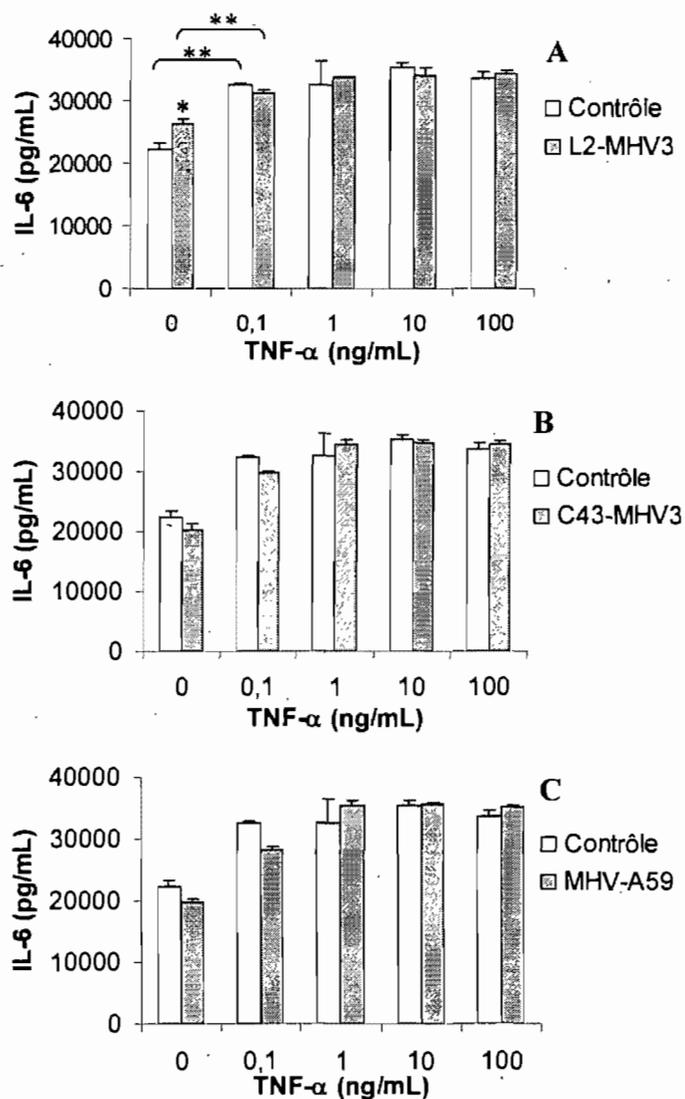


Figure 18. Production d'IL-6 par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris C57BL/6 en présence de TNF- α .

Les cellules non-infectées ou infectées *in vitro* par les virus L2-MHV3 (A), C43-MHV3 (B) et MHV-A59 (C) avec des suspensions virales à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1 ont été incubées durant 24h avec des concentrations de TNF- α allant de 0 à 100 ng/mL. Les surnageants ont été récoltés et l'IL-6 a été dosée par un test ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

quantité de PGE₂ produite par les cellules non-infectées ($p < 0,05$), alors que la PGE₂ a été augmentée avec des concentrations plus élevées (10 et 100 ng/mL) de TNF- α ($p < 0,05$) (Fig. 19A). Par contre, la diminution de la production de PGE₂ lors de l'infection avec les virus L2-MHV3 et C43-MHV3 ($p < 0,05$) a été compensée par l'ajout de TNF- α (Fig. 19A et B). D'autre part, le virus MHV-A59 a stimulé la production de PGE₂ en présence de la plus faible dose de TNF- α (0,1 ng/mL) ($p < 0,01$), mais a complètement empêché l'augmentation de la PGE₂ induite avec les concentrations de TNF- α de 1, 10 et 100 ng/mL (Fig. 19C).

4.1.12- Effets de l'ajout de TNF- α sur la production d'IL-6 et de la PGE₂ par les cellules endothéliales cérébrales de souris SJL

Comme les trois virus n'avaient pas affectés la production d'IL-6 et de PGE₂ par les cellules endothéliales de souris SJL, nous avons alors vérifié si les infections virales n'avaient aucun effet sur la stimulation de la production d'IL-6 et de PGE₂ par l'addition de TNF- α . Ainsi, des cellules endothéliales cérébrales de souris SJL ont été mises en culture, infectées avec les trois virus et traitées avec différentes concentrations de TNF- α .

4.1.12.1- Interleukine-6 (IL-6)

Tel que montré dans la figure 20A, l'addition de TNF- α à une concentration de 1 ng/mL et plus a permis d'augmenter la production d'IL-6 par les cellules endothéliales cérébrales ($p < 0,05$). Par contre, en présence des trois virus, l'addition de TNF- α a fortement augmenté la production d'IL-6 et ce, proportionnellement à la concentration utilisée ($p < 0,05$ à 0,005) (Fig. 20A à C). Le virus MHV-A59 est celui qui a induit la plus forte hausse (Fig. 20C).

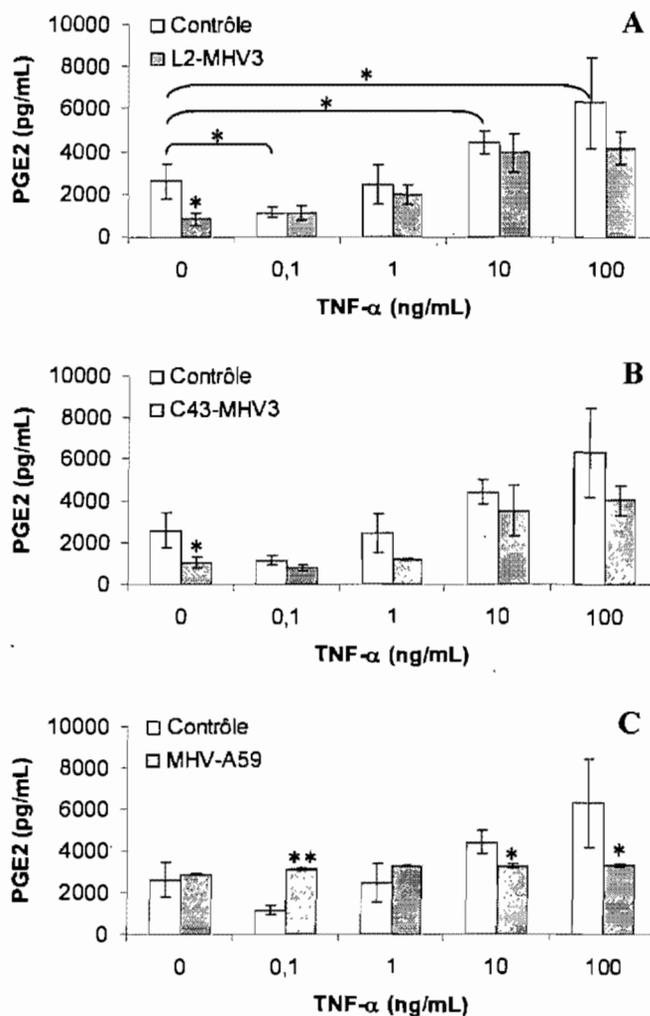


Figure 19. Production de PGE₂ par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris C57BL/6 en présence de TNF- α .

Les cellules non-infectées ou infectées *in vitro* par les virus L2-MHV3 (A), C43-MHV3 (B) et MHV-A59 (C) avec des suspensions virales à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1 ont été incubées durant 24h avec des concentrations de TNF- α allant de 0 à 100 ng/mL. Les surnageants ont été récoltés et la PGE₂ a été dosée par un test ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. *p<0,05 **p<0,01

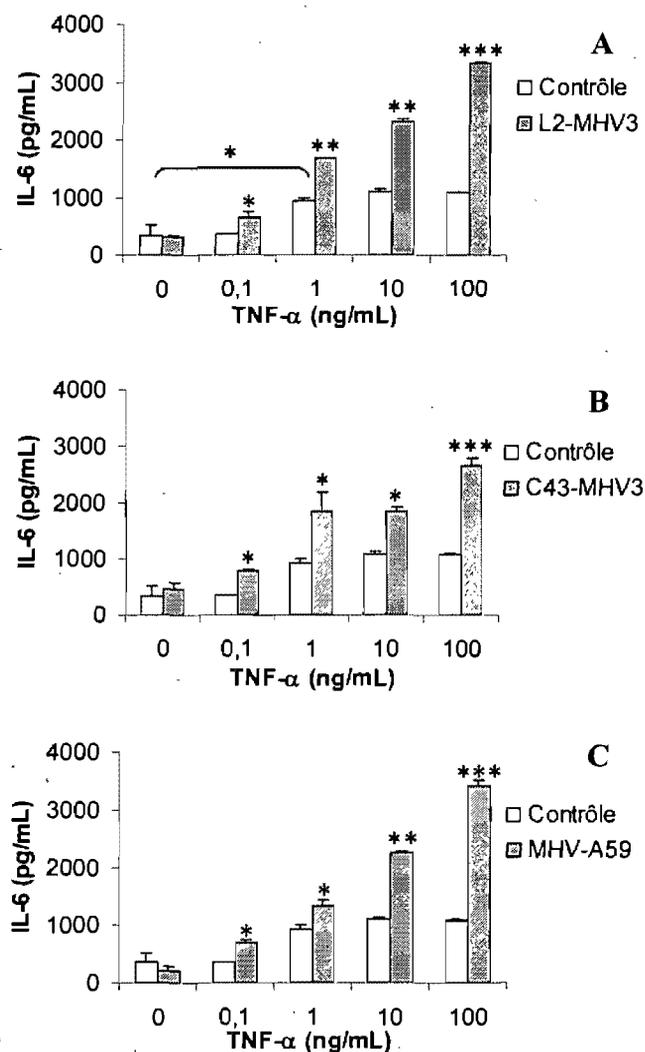


Figure 20. Production d'IL-6 par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris SJL en présence de TNF- α .

Les cellules non-infectées ou infectées *in vitro* par les virus L2-MHV3 (A), C43-MHV3 (B) et MHV-A59 (C) avec des suspensions virales à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1 ont été incubées durant 24h avec des concentrations de TNF- α allant de 0 à 100 ng/mL. Les surnageants ont été récoltés et l'IL-6 a été dosée par un test ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$

4.1.12.2- Prostaglandine E₂ (PGE₂)

Similairement, la production de PGE₂ en présence de TNF- α et des virus a été évaluée chez ces cellules à 24h et 96h. L'addition de TNF- α n'a pas augmenté la production de PGE₂ par les cellules endothéliales cérébrales sauf à des concentrations de 100 ng/mL après 24h et de 10 et 100 ng/mL après 96h ($p < 0,01$ à $0,005$) (Fig. 21A et D). Par contre, ces augmentations ont été fortement inhibées par l'infection avec chacun des trois virus, particulièrement après 96h d'infection ($p < 0,05$ à $0,005$) (Fig. 21A à F).

4.1.13- Effet de l'ajout de TNF- α sur la production d'IL-6 et de PGE₂ par les cellules endothéliales cérébrales de souris *Ceacam-1a*^{-/-}

Afin de confirmer si les effets inhibiteurs de la production d'IL-6 et de PGE₂ par les cellules endothéliales de souris *Ceacam-1a*^{-/-} en présence des trois virus pouvaient être contrés par la stimulation par le TNF- α , des cellules endothéliales cérébrales de souris *Ceacam-1a*^{-/-} ont été similairement traitées et l'IL-6 et la PGE₂ ont été dosées.

4.1.13.1- Interleukine-6 (IL-6)

Tel que montré à la figure 22A, les cellules endothéliales cérébrales sont fortement stimulées par le TNF- α à produire de l'IL-6 ($p < 0,005$). Les trois virus ont diminué la production d'IL-6 seulement en présence des plus faibles concentrations de TNF- α (1ng/mL et moins) ($p < 0,05$ à $0,01$) (Fig. 22A à C).

4.1.13.2- Prostaglandine E₂ (PGE₂)

D'autre part, la production de PGE₂ par les cellules endothéliales de souris *Ceacam-1a*^{-/-} non-infectées a augmenté en fonction de la concentration de TNF- α (Fig. 23A). Par contre, l'augmentation de PGE₂ a été diminuée par le virus L2-MHV3 en présence de faibles concentrations de TNF- α (0.1 à 10 ng/mL) ($p < 0,05$) (Fig. 23A), par le virus C43-MHV3 à toutes les concentrations de TNF- α testées ($p < 0,05$) (Fig. 23B), et similairement par le virus MHV-A59 ($p < 0,05$) (Fig. 23C) à l'exception de la concentration 10 ng/mL de TNF- α , où la diminution de la production de PGE₂ n'a pas atteint un seuil statistiquement significatif.

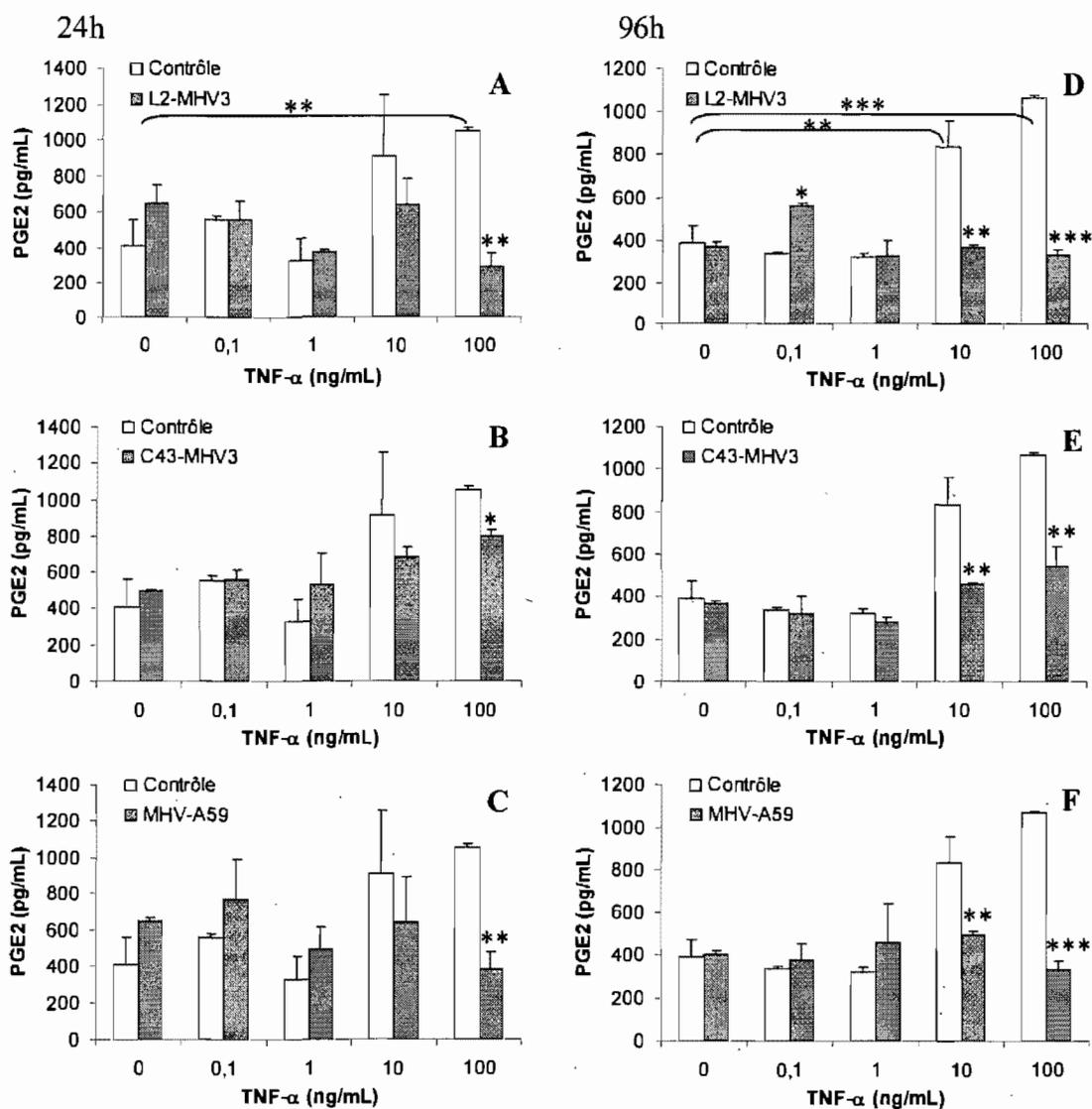


Figure 21. Production de PGE₂ par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris SJL en présence de TNF- α .

Les cellules non-infectées ou infectées *in vitro* avec des suspensions virales à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1 ont été incubées durant 24h (A à C) ou 96h (D à F) avec des concentrations de TNF- α allant de 0 à 100 ng/mL. Les surnageants ont été récoltés et la PGE₂ a été dosée par un test ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,005

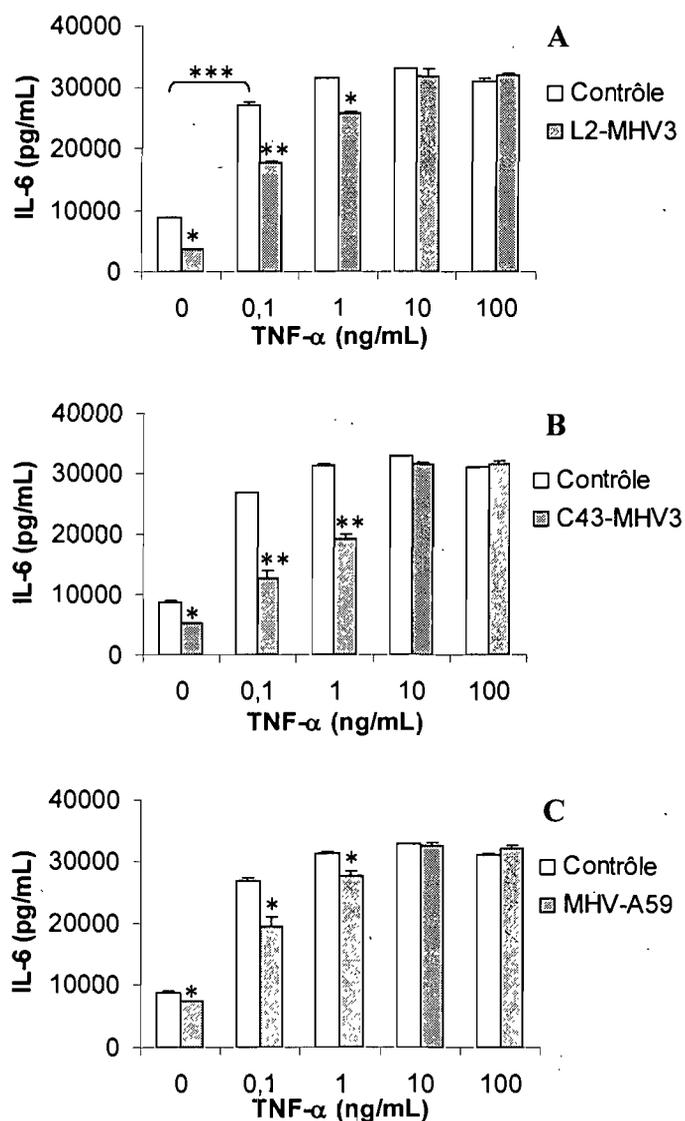


Figure 22. Production d'IL-6 par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris *Ceacam-1a-/-* en présence de TNF- α .

Les cellules non-infectées ou infectées *in vitro* par les virus L2-MHV3 (A), C43-MHV3 (B) et MHV-A59 (C) avec des suspensions virales à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1 ont été incubées durant 24h avec des concentrations de TNF- α allant de 0 à 100 ng/mL. Les surnageants ont été récoltés et l'IL-6 a été dosée par un test ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,005

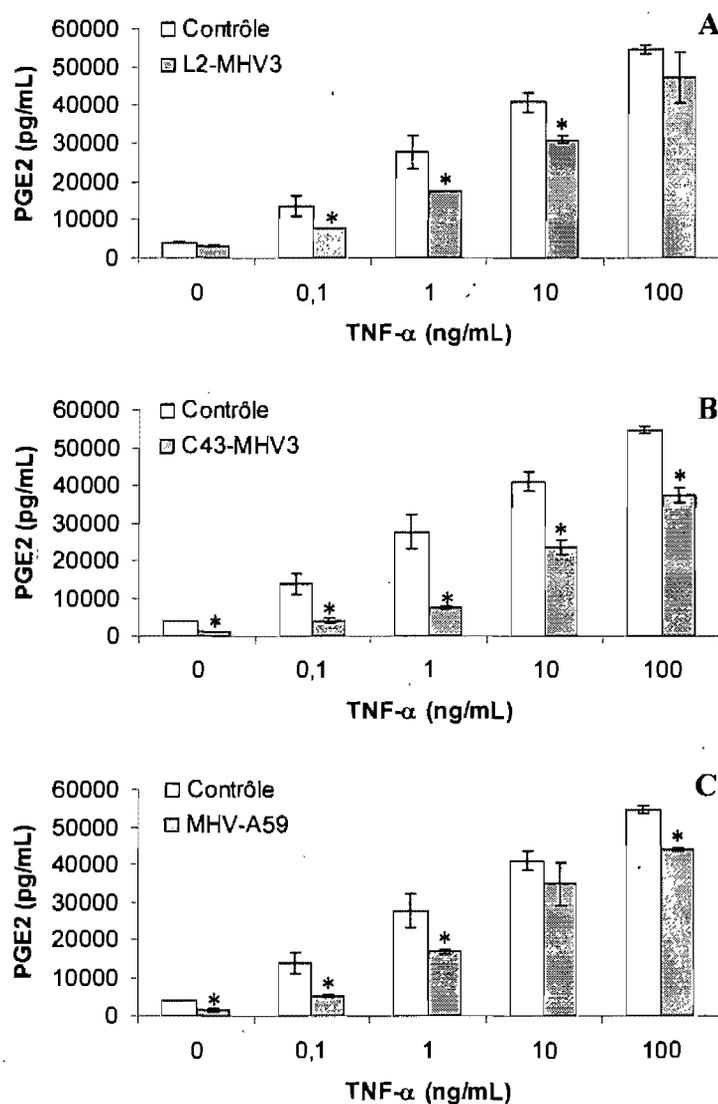


Figure 23. Production de PGE₂ par des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de souris *Ceacam-1a*^{-/-} en présence de TNF- α .

Les cellules non-infectées ou infectées *in vitro* par les virus L2-MHV3 (A), C43-MHV3 (B) et MHV-A59 (C) avec des suspensions virales à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1 ont été incubées durant 24h avec des concentrations de TNF- α allant de 0 à 100 ng/mL. Les surnageants ont été récoltés et la PGE₂ a été dosée par un test ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. *p<0,05

4.2- Effets des infections virales sur les propriétés inflammatoires des macrophages myéloïdes

Les macrophages sont des cellules-cibles importantes pour les virus MHV mais ces cellules sont aussi impliquées dans la production de cytokines inflammatoires pouvant affecter les fonctions des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux (Schindler *et al.*, 1983). Comme les macrophages myéloïdes montrent des similarités fonctionnelles avec les cellules de la microglie (Lee *et al.*, 2002), des macrophages myéloïdes ont été utilisées, pour les expériences subséquentes, à cause de leur facilité d'isolement et de leur nombre supérieur à celui des cellules de la microglie, permettant ainsi de diminuer le nombre d'animaux nécessaires en accord avec les objectifs du CIPA. Ainsi, nous avons alors vérifié si l'infection par les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 pouvait altérer la production des cytokines inflammatoires par les macrophages.

4.2.1- Production de TNF- α par les macrophages de la moelle osseuse

Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire dont la principale source cellulaire est le macrophage. Comme elle est d'une importance capitale pour l'initiation de la réponse immunitaire anti-virale, des macrophages myéloïdes de souris C57BL/6, SJL et *Ceacam-1a*^{-/-} ont été isolés, mis en culture et infectés *in vitro* par les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59. La production de TNF- α dans les surnageants de cultures de macrophages a été quantifiée après 24h par un test ELISA. Tel que montré à la figure 24, l'infection des macrophages de souris C57BL/6 et SJL avec chacun des trois virus a entraîné une diminution de la production de TNF- α ($p < 0,05$ à $0,01$). Par contre, la diminution de la production de TNF- α n'a pas été observée chez les macrophages de moelle osseuse des souris *Ceacam-1a*^{-/-} infectés avec les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59.

4.2.2- Production d'IL-6 par les macrophages de la moelle osseuse

De façon similaire aux infections réalisées pour le dosage de TNF- α , la concentration d'IL-6 dans les surnageants de cultures primaires de macrophages de moelle osseuse de souris C57BL/6, SJL et *Ceacam-1a*^{-/-} a été mesurée après 24h

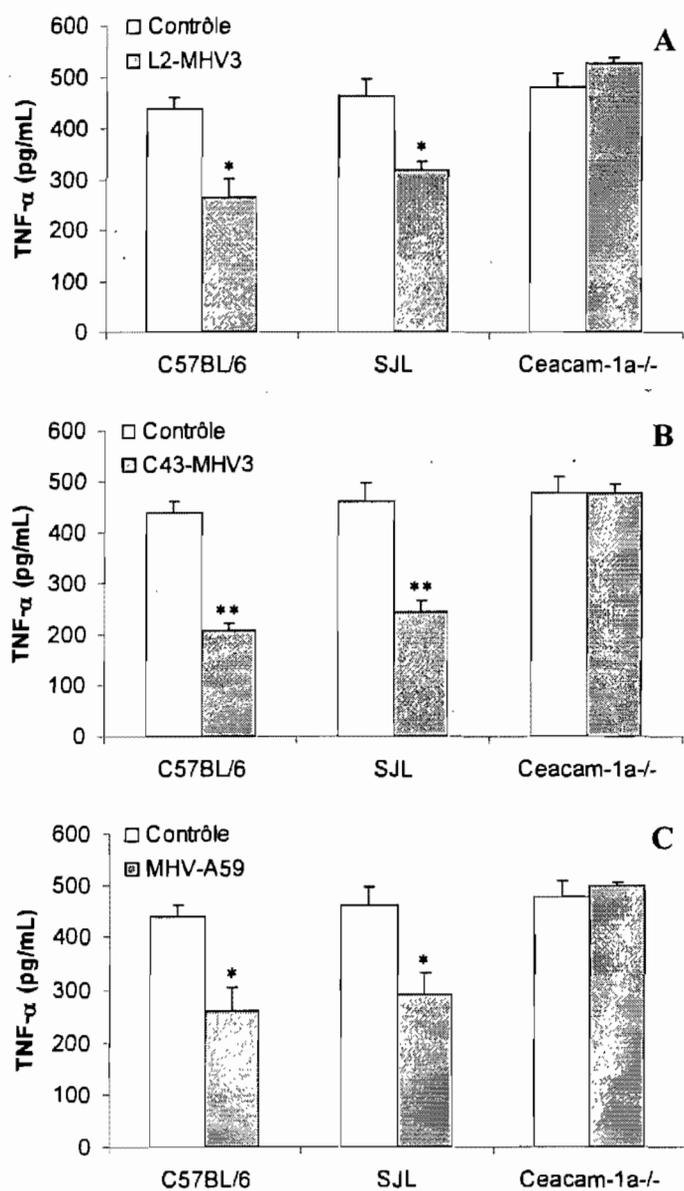


Figure 24. Production de TNF- α par les macrophages de la moelle osseuse de souris C57BL/6, SJL et Ceacam-1a^{-/-} infectés.

Les cellules ont été infectées *in vitro* durant 24h avec des suspensions virales de L2-MHV3 (A), C43-MHV3 (B) et MHV-A59 (C) à une multiplicité d'infection de 0.01 à 0.1. Les surnageants de cellules ont été récoltés après 24h d'infection et le TNF- α a été dosé par un test ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. * p<0,05 ** p<0,01

d'infection avec les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59. L'infection avec le virus L2-MHV3 a entraîné une diminution d'IL-6 seulement chez les macrophages provenant des souris C57BL/6 (Fig. 25A) ($p < 0,05$). La production d'IL-6 par les macrophages provenant de souris SJL et *Ceacam-1a*^{-/-} n'a pas été altérée par l'infection avec le L2-MHV3 (Fig. 25A). Des effets similaires ont été observés avec les virus C43-MHV3 et MHV-A59 (Fig. 25B et C) ($p < 0,05$).

4.2.3- Production d'IL-10 par les macrophages de la moelle osseuse

La concentration d'IL-10 dans les surnageants de macrophages de moelle osseuse en culture a aussi été mesurée après 24h d'infection avec les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59. Tel que montré à la figure 26, les macrophages non-infectés de souris *Ceacam-1a*^{-/-} ont produit plus d'IL-10 que ceux de souris C57BL/6 alors que ceux de la souris SJL relâchaient moins d'IL-10 que les deux autres lignées de souris. Par contre, la présence des trois virus a entraîné une diminution comparable d'IL-10 quelque soit la provenance des macrophages (Fig. 26) ($p < 0,01$).

4.2.4- Production d'IL-12 par les macrophages de la moelle osseuse

La production d'IL-12 par les macrophages de la moelle osseuse infectés *in vitro* par les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 a aussi été mesurée après 24h dans les surnageants de cellules en culture. Contrairement aux macrophages des souris C57BL/6 ou *Ceacam-1a*^{-/-}, les cellules de souris SJL produisaient légèrement plus d'IL-12. Suite à l'infection avec chacun des trois virus, l'IL-12 a été fortement diminuée chez les macrophages de moelle osseuse provenant des trois souches murines (Fig. 27A à C) ($p < 0,05$ à $0,01$).

4.2.5- Implication des récepteurs CEACAM-1a, TLR2 et héparanes sulfates dans l'inhibition de la production de cytokines macrophagiques.

Compte tenu des différences observées entre les lignées de souris dans l'inhibition des cytokines macrophagiques par les différents virus, il est proposé que non seulement le récepteur CEACAM-1a peut être impliqué, mais aussi d'autres récepteurs, tels que le TLR2 et les régions héparanes sulfates. D'autre part, des travaux récents au laboratoire

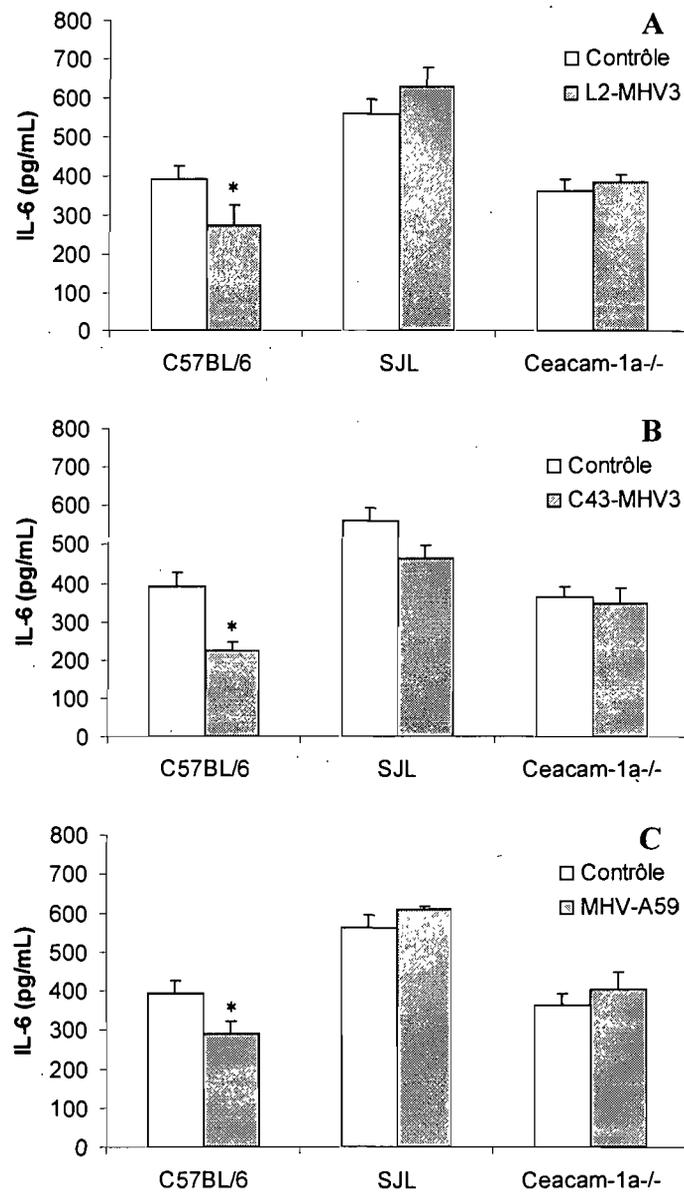


Figure 25. Production d'IL-6 par les macrophages de la moelle osseuse de souris C57BL/6, SJL et *Ceacam-1a*^{-/-} infectés.

Les cellules ont été infectées *in vitro* durant 24h avec des suspensions virales de L2-MHV3 (A), C43-MHV3 (B) et MHV-A59 (C) à une multiplicité d'infection de 0.01 à 0.1. Les surnageants de cellules ont été récoltés après 24h d'infection et l'IL-6 a été dosée par un test ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. *p<0,05

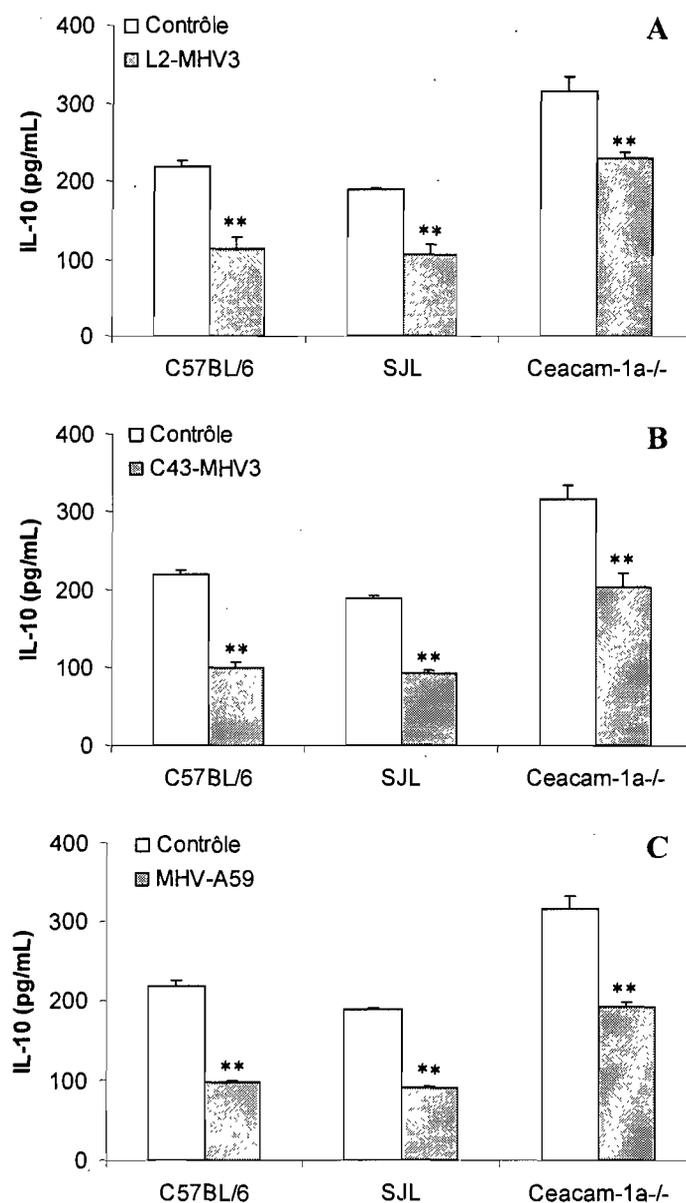


Figure 26. Production d'IL-10 par les macrophages de la moelle osseuse de souris C57BL/6, SJL et Ceacam-1a-/- infectés.

Les cellules ont été infectées *in vitro* durant 24h avec des suspensions virales de L2-MHV3 (A), C43-MHV3 (B) et MHV-A59 (C) à une multiplicité d'infection de 0.01 à 0.1. Les surnageants de cellules ont été récoltés après 24h d'infection et l'IL-10 a été dosée par un test ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. * $p < 0,05$
** $p < 0,01$

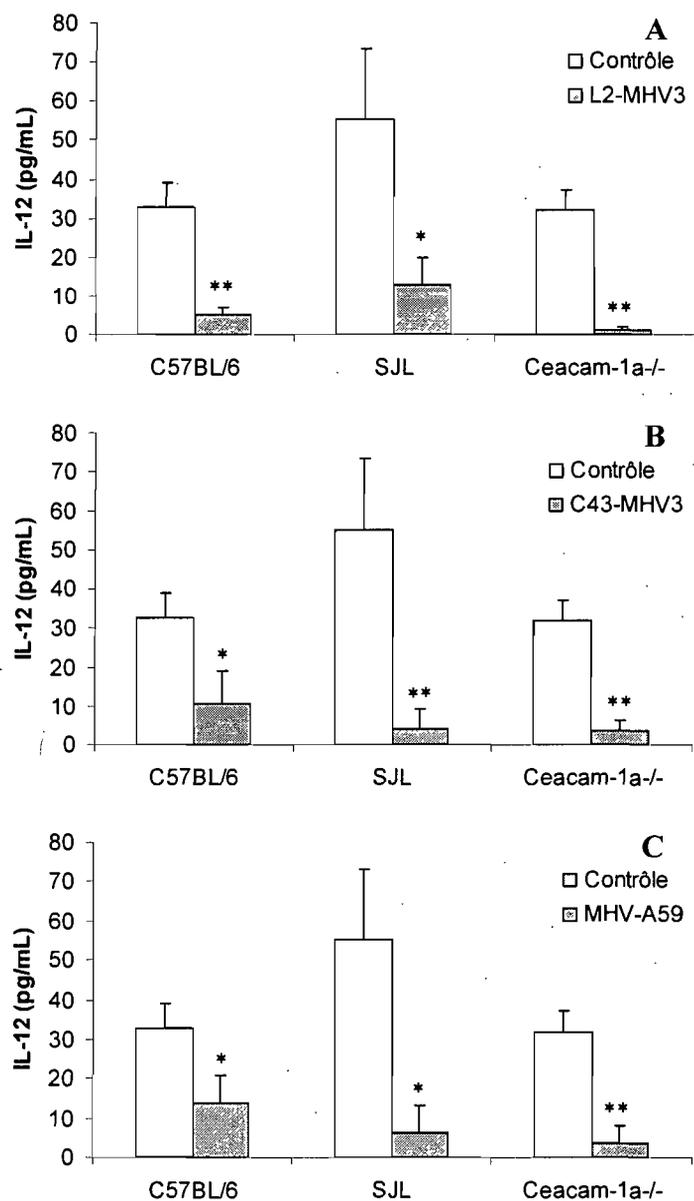


Figure 27. Production d'IL-12 par les macrophages de la moelle osseuse de souris C57BL/6, SJL et Ceacam-1a-/- infectés.

Les cellules ont été infectées *in vitro* durant 24h avec des suspensions virales de L2-MHV3 (A), C43-MHV3 (B) et MHV-A59 (C) à une multiplicité d'infection de 0.01 à 0.1. Les surnageants de cellules ont été récoltés après 24h d'infection et l'IL-12 a été dosée par un test ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. *p<0,05 **p<0,01

ont montré le rôle de l'association TLR2 / héparane-sulfate dans la production de cytokines macrophagiques en présence du virus L2-MHV3 (Jacques *et al.*, article en révision).

4.2.6- Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages de moelle osseuse en présence d'anticorps AgB10 bloquant le récepteur CEACAM-1a chez la souris C57BL/6

Afin de déterminer le rôle de l'engagement du récepteur CEACAM-1a par les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 dans l'inhibition des cytokines TNF- α , IL-6, IL-12 et IL-10 produites par les macrophages de moelle osseuse, ces cellules ont été incubées durant 1h avec l'anticorps AgB10, spécifique à la molécule CEACAM-1a, préalablement à leur infection. L'addition de cet anticorps n'a pas induit de variation dans la production de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-12 par les macrophages non-infectés quoiqu'une légère augmentation d'IL-10 ait été notée ($p < 0,05$) (Fig. 28C). Tel que montré à la figure 28A à C, l'ajout d'un anticorps spécifique au CEACAM-1a n'a pas modifié l'effet inhibiteur des trois virus sur la production de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-10 par les macrophages après 24h. L'inhibition de la production d'IL-12 induite par les virus C43-MHV3 et MHV-A59 n'a pas non plus été modifiée par l'ajout d'un anticorps anti-CEACAM-1a. Par contre, l'inhibition de la production d'IL-12 chez les macrophages en présence du virus L2-MHV3 a été réduite lorsque les cellules ont été incubées avec l'anticorps AgB10 avant l'infection (Fig. 28D) ($p < 0,05$).

4.2.7- Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages de moelle osseuse de souris C57BL/6 en présence d'héparine

Les résultats précédent suggèrent que les variations dans le niveau des cytokines produites suite aux infections virales, à l'exception de l'IL-12, ne dépendent pas du récepteur CEACAM-1a. Puisque les macrophages myéloïdes possèdent des récepteurs héparanes sulfates, il est proposé que la fixation des virus aux récepteurs héparanes sulfates pourrait être responsable de l'inhibition de la production de cytokines chez les macrophages de moelle osseuse de souris C57BL/6. Les macrophages ont alors été mis en présence d'héparine avant d'être infectés par les virus L2-MHV3, C43-MHV3 ou

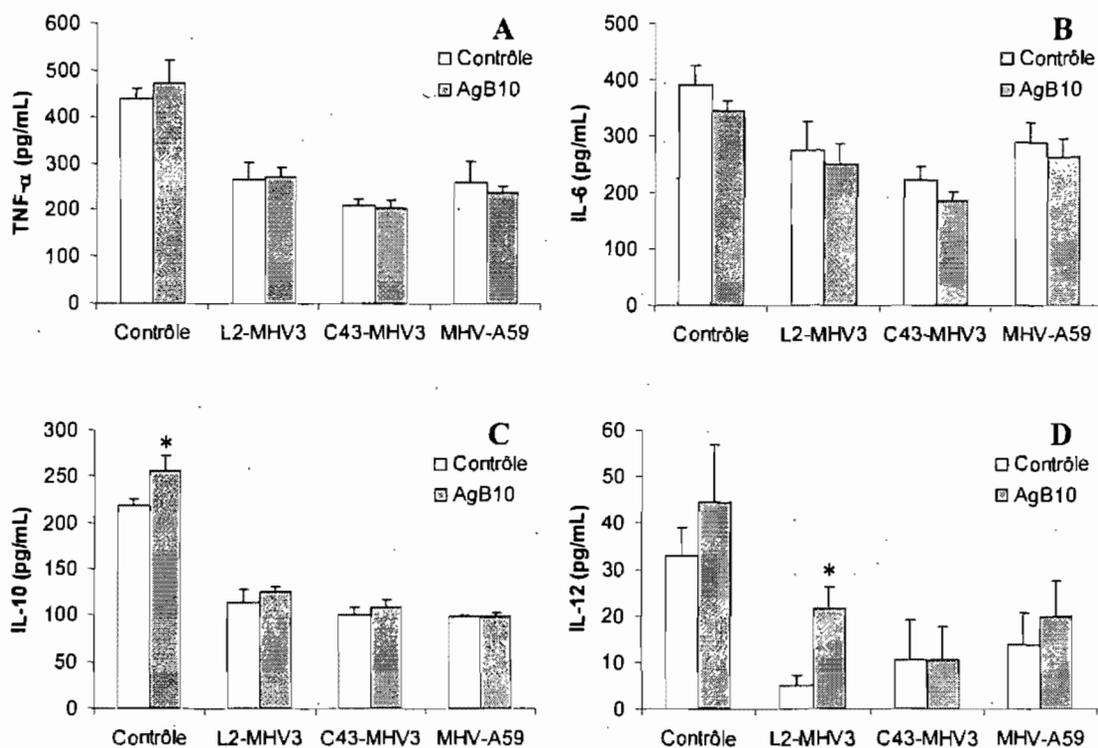


Figure 28. Production de cytokines par les macrophages de la moelle osseuse de souris C57BL/6 infectés en présence d'un anticorps anti-CEACAM-1a.

Les cellules ont été incubées avec l'anticorps AgB10 à une concentration de 1,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durant 1h avant l'infection avec les suspensions virales de L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 à une multiplicité d'infection de 0.01 à 0.1. Les surnageants de cellules ont été récoltés après 24h d'infection et le TNF- α (A), l'IL-6 (B), l'IL-10 (C) et l'IL-12 (D) ont été dosés par des tests ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. * $p < 0,05$

MHV-A59. Tel que montré la figure 29, l'addition d'héparine a eu pour effet de réduire la production de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-10 par les macrophages non-infectés, mais elle n'a pas affecté les niveaux d'IL-12 ($p < 0,05$ à $0,01$). L'effet inhibiteur des virus sur la production de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-10 par les macrophages n'a pas été renversé par la présence d'héparine. Au contraire, l'héparine a eu un effet additif à l'effet inhibiteur des infections virales ($p < 0,05$) (Fig. 29A à C). Par contre, la diminution d'IL-6 induite par l'héparine a été contrée chez les macrophages infectés avec le virus MHV-A59 (Fig. 29B). L'héparine a contré l'inhibition de la production d'IL-12 chez les macrophages en présence du virus L2-MHV3 ($p < 0,05$) (Fig. 29D). Par contre, l'incubation des macrophages avec l'héparine avant leur infection n'a eu aucun effet sur l'inhibition de la production d'IL-12 induite par les virus C43-MHV3 et MHV-A59.

4.2.8- Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages de moelle osseuse de souris C57BL/6 en présence d'un inhibiteur du TLR2

Les récepteurs TLR sont des récepteurs importants dans l'induction de cytokines par les macrophages. Afin de vérifier si les récepteurs TLR2 étaient impliqués dans l'inhibition de la production de cytokines macrophagiques suite à l'infection par chacun des trois virus, les macrophages ont été incubés avec un inhibiteur du TLR2 avant l'infection. Tel que montré dans la figure 30, la production d'IL-6 et d'IL-10 par les macrophages non-infectés de souris C57BL/6 a diminué en présence de l'inhibiteur du TLR2 ($p < 0,05$). Par contre, l'inhibiteur du TLR2 n'a pas modifié la baisse de TNF- α chez les cellules infectées par les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 (Fig. 30A). L'inhibition du TLR2 a toutefois aggravé la diminution de la production d'IL-6 par les macrophages infectés par les virus C43-MHV3 et MHV-A59 ($p < 0,05$), mais pas de façon significative avec le virus L2-MHV3 (Fig. 30B). De plus, l'anticorps anti-TLR2 a augmenté l'inhibition de la production d'IL-10 par les macrophages infectés avec les virus C43-MHV3 et MHV-A59 ($p < 0,05$) (Fig. 30C). Par contre, cet effet inhibiteur n'était pas significativement présent chez les cellules infectées avec le virus L2-MHV3. L'inhibiteur du TLR2 a eu un effet correctif sur le niveau d'IL-12 chez les macrophages infectés par

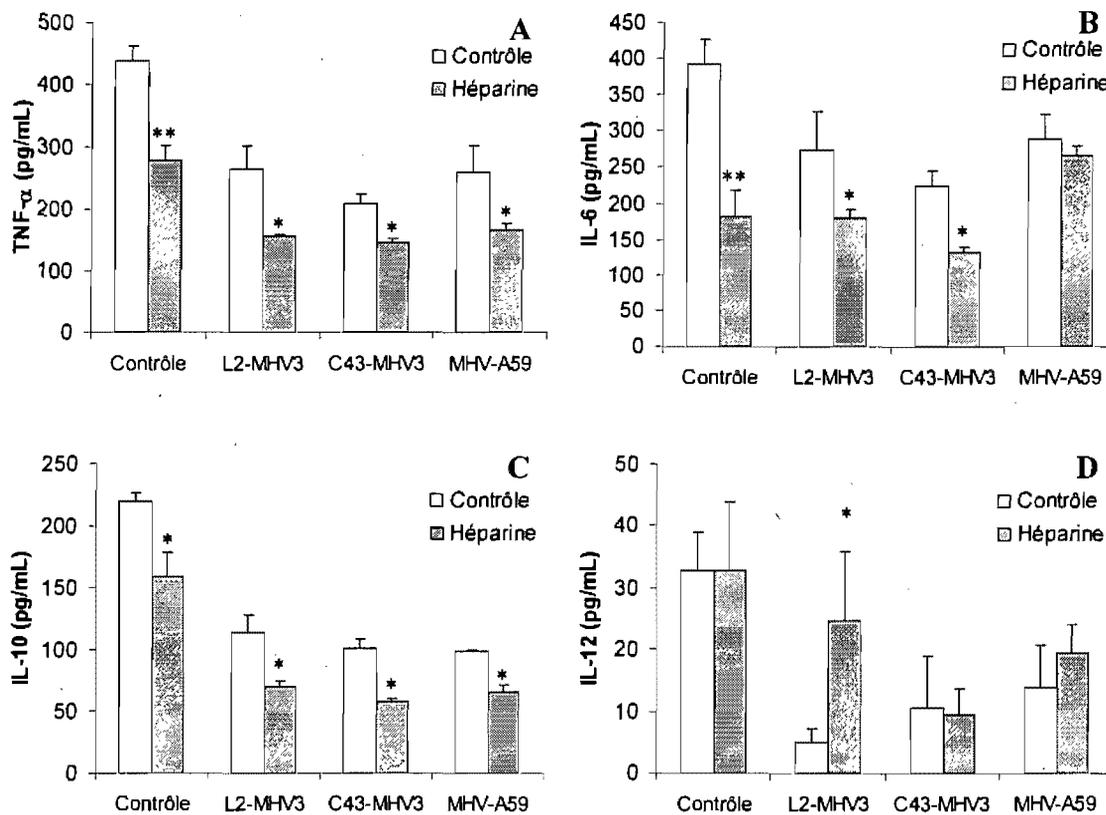


Figure 29. Production de cytokines par les macrophages de la moelle osseuse de souris C57BL/6 infectés en présence d'héparine.

Les cellules ont été incubées avec l'héparine à une concentration de 400 U/mL durant 1h avant l'infection avec les suspensions virales de L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 à une multiplicité d'infection de 0.01 à 0.1. Les surnageants de cellules ont été récoltés après 24h d'infection et le TNF- α (A), l'IL-6 (B), l'IL-10 (C) et l'IL-12 (D) ont été dosés par des tests ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

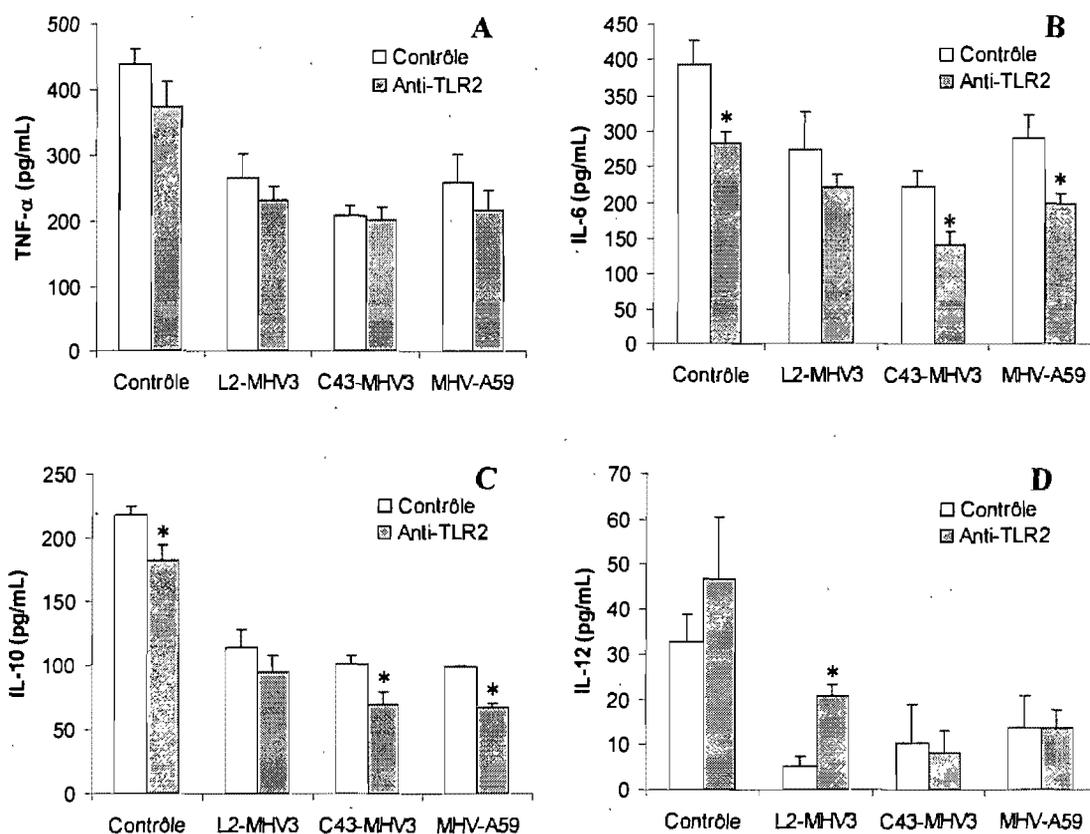


Figure 30. Production de cytokines par les macrophages de la moelle osseuse de souris C57BL/6 infectés en présence d'un inhibiteur du TLR2.

Les cellules ont été incubées avec un inhibiteur du TLR2 à une concentration de 500 ng/mL durant 1h avant l'infection avec les suspensions virales de L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 à une multiplicité d'infection de 0.01 à 0.1. Les surnageants de cellules ont été récoltés après 24h d'infection et le TNF- α (A), l'IL-6 (B), l'IL-10 (C) et l'IL-12 (D) ont été dosés par des tests ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. * $p < 0,05$

le virus L2-MHV3 seulement ($p < 0,05$) (Fig. 30D).

4.2.9- Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages de moelle osseuse de souris C57BL/6 en présence d'héparine et d'un inhibiteur du TLR2

Afin de vérifier si la diminution de production de cytokines macrophagiques pourrait être due à l'action synergique des récepteurs TLR2 et héparanes sulfates plutôt que par l'action unique de l'un ou l'autre de ces récepteurs, les macrophages ont été incubés avec de l'héparine et un inhibiteur du TLR2. La combinaison d'héparine et de l'inhibiteur du TLR2 a eu pour effet d'entraîner une forte chute dans la production de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-10 autant chez les macrophages non-infectés qu'infectés avec les trois virus ($p < 0,01$ à $0,005$) (Fig. 31A à C). La production d'IL-12 n'a toutefois pas été altérée chez les macrophages non-infectés (Fig. 31D). Tout comme pour l'héparine seule ou l'inhibiteur du TLR2 seul, la combinaison d'héparine et de l'inhibiteur du TLR2 a réduit l'inhibition de la production d'IL-12 induite par le virus L2-MHV3 ($p < 0,05$) (Fig. 31D). La combinaison d'héparine et de l'inhibiteur du TLR2 a également diminué l'inhibition de la production d'IL-12 provoquée par le virus MHV-A59 ($p < 0,05$) (Fig. 31D), effet qui n'avait pas été observé chez les macrophages infectés en présence d'héparine seule ou d'inhibiteur du TLR2 seul.

4.2.10- Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages de moelle osseuse de souris SJL en présence d'héparine

Une inhibition du TNF- α , de l'IL-12 et de l'IL-10, mais non pas de l'IL-6, a été observée chez les macrophages de moelle osseuse de souris SJL après 24h d'infection par les différents virus (sections 4.2.1 à 4.2.4). Afin de déterminer si cette inhibition pouvait être provoquée par la fixation des virus aux récepteurs héparanes sulfates, les macrophages ont été mis en présence d'héparine avant d'être infectés par les virus L2-MHV3, C43-MHV3 ou MHV-A59. Tel que montré dans la figure 32A et B, l'addition d'héparine a eu pour effet de réduire significativement la production de TNF- α et d'IL-6 par les macrophages non-infectés ($p < 0,05$). L'effet inhibiteur de l'héparine sur la

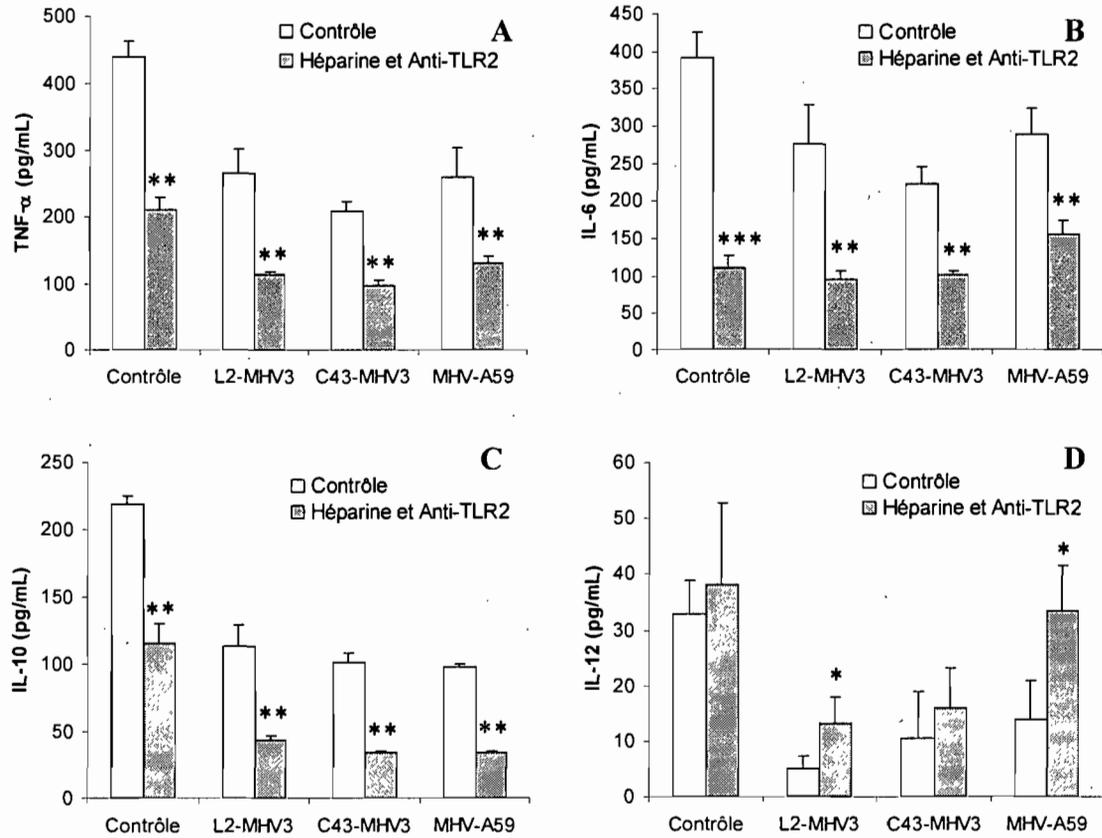


Figure 31. Production de cytokines par les macrophages de la moelle osseuse de souris C57BL/6 infectés en présence d'héparine et d'un inhibiteur du TLR2.

Les cellules ont été incubées avec l'héparine (400 U/mL) et un inhibiteur du TLR2 (500 ng/mL) durant 1h avant l'infection avec les suspensions virales de L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 à une multiplicité d'infection de 0.01 à 0.1. Les surnageants de cellules ont été récoltés après 24h d'infection et le TNF- α (A), l'IL-6 (B), l'IL-10 (C) et l'IL-12 (D) ont été dosés par des tests ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$

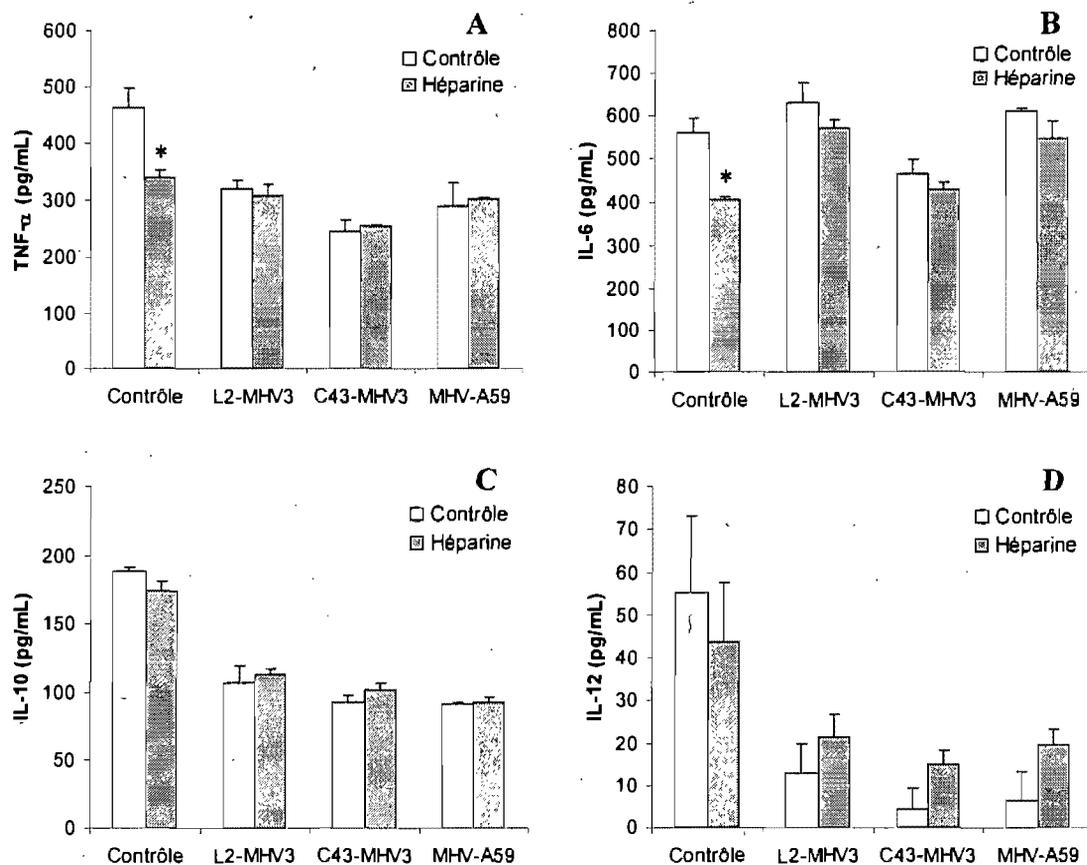


Figure 32. Production de cytokines par les macrophages de la moelle osseuse de souris SJL infectés en présence d'héparine.

Les cellules ont été incubées avec l'héparine à une concentration de 400 U/mL durant 1h avant l'infection avec les suspensions virales de L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 à une multiplicité d'infection de 0.01 à 0.1. Les surnageants de cellules ont été récoltés après 24h d'infection et le TNF- α (A), l'IL-6 (B), l'IL-10 (C) et l'IL-12 (D) ont été dosés par des tests ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicate. * $p < 0,05$

production de TNF- α a toutefois été renversé par la présence de virus. En effet, l'addition d'héparine n'a pas accentué la baisse de TNF- α induite par les trois virus (Fig. 32A). L'effet inhibiteur de l'héparine sur la production d'IL-6, observé chez les cellules non-infectées, a disparu chez les macrophages infectés par l'un ou l'autre des virus (Fig. 32B). La production d'IL-12 n'a pas été diminuée par l'héparine autant chez les cellules non-infectées que chez celles infectées par les trois virus après 24h (Fig. 32D). De plus, l'incubation des macrophages de souris SJL avec l'héparine n'a pas contré l'inhibition de la production d'IL-10 chez les cellules infectées (Fig. 32C).

4.2.11- Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages de moelle osseuse de souris SJL en présence d'un inhibiteur du TLR2

Afin de vérifier si les récepteurs TLR2 peuvent aussi être impliqués dans l'inhibition de la production de cytokines par les trois virus chez les macrophages de souris SJL, ces cellules ont été incubées avec un inhibiteur du TLR2 avant l'infection. La figure 33A à C montre que l'ajout de l'inhibiteur du TLR2 a faiblement inhibé la production de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-10 par les macrophages non-infectés ($p < 0,05$). Par contre, cet inhibiteur a aggravé la diminution de la production de TNF- α et d'IL-10 et a induit une diminution d'IL-6 chez les cellules infectées avec chacun des virus ($p < 0,05$ à $0,01$) (Fig. 33A à C). L'ajout de l'inhibiteur du TLR2 n'a pas affecté la production d'IL-12 autant chez les macrophages de souris SJL non-infectés qu'infectés avec chacun des trois virus, même si cette dernière cytokine avait été fortement diminuée par les virus (Fig. 33D).

4.2.12- Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages de moelle osseuse de souris SJL en présence d'héparine et d'un inhibiteur du TLR2

Nous avons précédemment observé, chez les macrophages de souris C57BL/6, que la combinaison d'héparine et d'inhibiteur du TLR2 avait eu pour effet d'entraîner une chute importante dans la production de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-10 (section 4.2.9). Afin de vérifier si les macrophages de souris SJL infectés ou non sont aussi affectés par l'engagement de ces récepteurs, ces derniers ont été traités avec l'héparine et

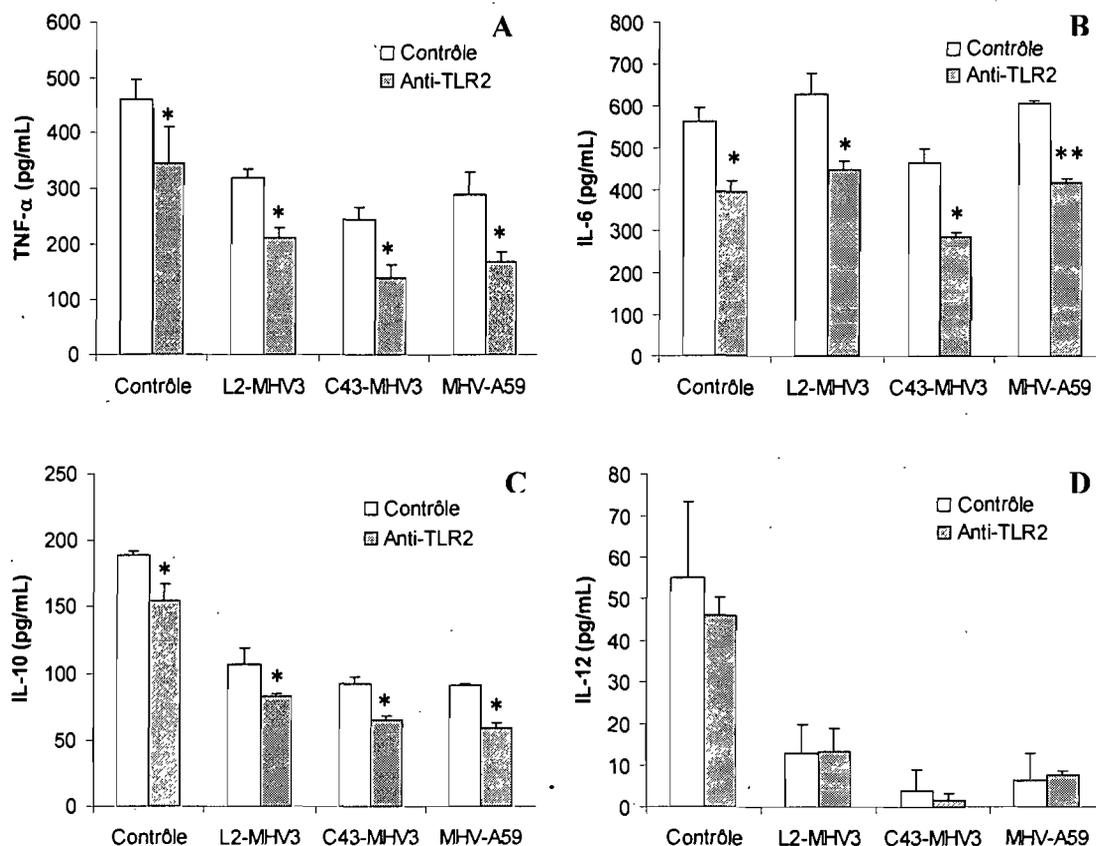


Figure 33. Production de cytokines par les macrophages de la moelle osseuse de souris SJL infectés en présence d'un inhibiteur du TLR2.

Les cellules ont été incubées avec un inhibiteur du TLR2 (500 ng/mL) durant 1h avant l'infection avec les suspensions virales de L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 à une multiplicité d'infection de 0.01 à 0.1. Les surnageants cellulaires ont été récoltés après 24h d'infection et le TNF- α (A), l'IL-6 (B), l'IL-10 (C) et l'IL-12 (D) ont été dosés par des tests ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

l'inhibiteur du TLR2 et les différentes cytokines ont été dosées. La production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 a diminué chez les macrophages non-infectés de souris SJL en présence d'héparine et d'inhibiteur du TLR2 ($p < 0,05$ à $0,01$) (Fig. 34A à D). La baisse de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-10 induite par les différents virus n'a pas été inhibée par l'addition de l'héparine et de l'inhibiteur du TLR2 (Fig. 34A à C). Aucune inhibition additionnelle de l'IL-12 n'a été notée en présence des virus L2-MHV3 et MHV-A59 (Fig. 34D), alors qu'une augmentation de la production d'IL-12 a été remarquée chez les macrophages infectés par le virus C43-MHV3 ($p < 0,05$). En effet, la baisse de la production d'IL-12 induite par le virus C43-MHV3 a été partiellement inhibée en présence d'héparine et d'inhibiteur du TLR2 combinés (Fig. 34D).

4.2.13- Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages de moelle osseuse de souris *Ceacam-1a*^{-/-} en présence d'héparine

L'utilisation de macrophages myéloïdes de souris C57BL/6 n'exprimant pas le gène *Ceacam-1a* nous permet de distinguer les effets des récepteurs héparanes sulfates et TLR2 de ceux du récepteur viral sur la production de cytokines. Ainsi, des infections virales ont été réalisées sur des macrophages myéloïdes provenant de ces souris, en absence ou en présence d'héparine dans un premier temps, et les cytokines produites ont été quantifiées. Nous avons précédemment observé qu'en présence des virus, la production de l'IL-10 et de l'IL-12 par les macrophages de moelle osseuse de souris *Ceacam-1a*^{-/-} était diminuée après 24h (sections 4.2.3 et 4.2.4) alors que les quantités de TNF- α et d'IL-6 n'ont pas été modifiées (sections 4.2.1 et 4.2.2). Afin de déterminer si l'inhibition d'IL-10 et d'IL-12 pouvait être provoquée par la fixation des virus aux récepteurs héparanes sulfates, les macrophages ont été mis en présence d'héparine préalablement à l'ajout des virus L2-MHV3, C43-MHV3 ou MHV-A59 dans le milieu. Tel que montré dans la figure 35A et B, l'addition d'héparine n'a pas eu d'effet sur la production de TNF- α et d'IL-6 par les macrophages en présence ou non de virus. La production d'IL-10 a diminué chez les macrophages non-infectés lorsqu'incubés avec de l'héparine ($p < 0,05$) (Fig. 35C). L'ajout d'héparine chez les macrophages en présence de l'un ou l'autre des trois virus a aggravé la diminution de la production d'IL-10 ($p < 0,05$) (Fig. 35C). Par contre, la présence d'héparine a

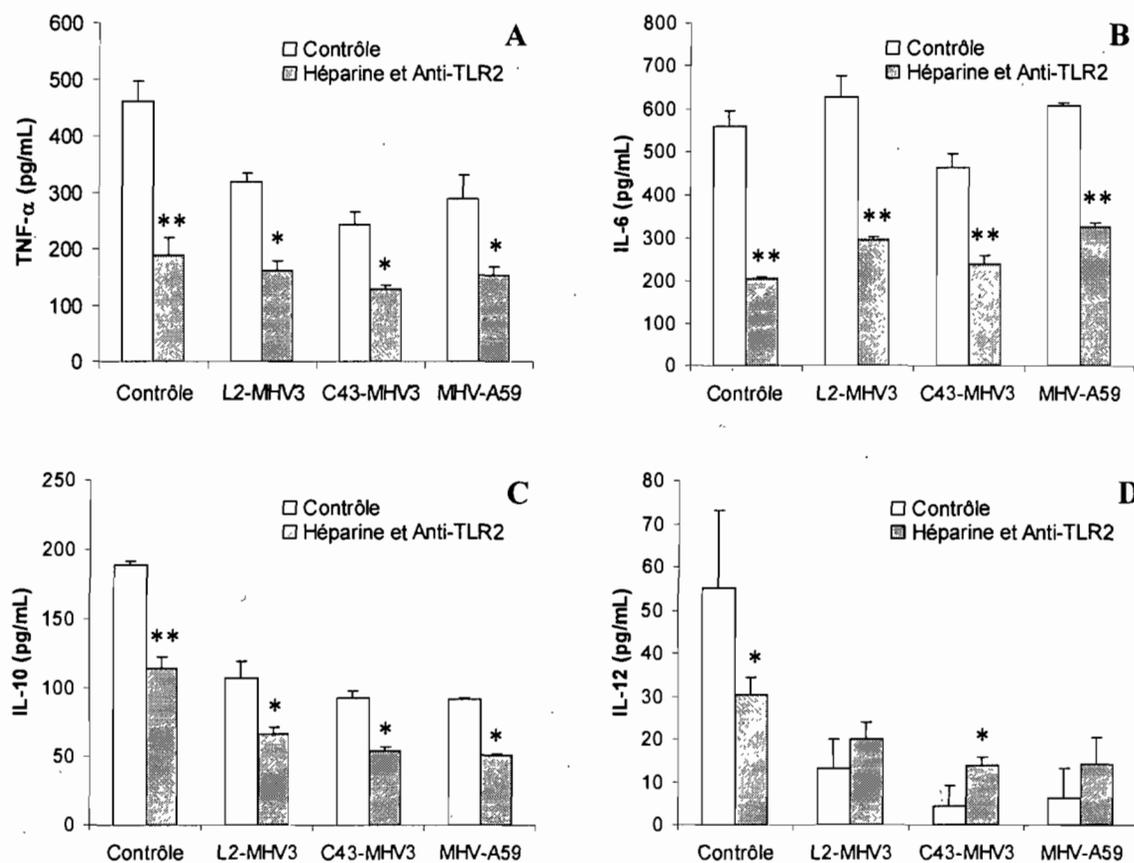


Figure 34. Production de cytokines par les macrophages de la moelle osseuse de souris SJL infectés en présence d'héparine et d'un inhibiteur du TLR2.

Les cellules ont été incubées avec l'héparine (400 U/mL) et un inhibiteur du TLR2 (500 ng/mL) durant 1h avant l'infection avec les suspensions virales de L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 à une multiplicité d'infection de 0.01 à 0.1. Les surnageants de cellules ont été récoltés après 24h d'infection et le TNF- α (A), l'IL-6 (B), l'IL-10 (C) et l'IL-12 (D) ont été dosés par des tests ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

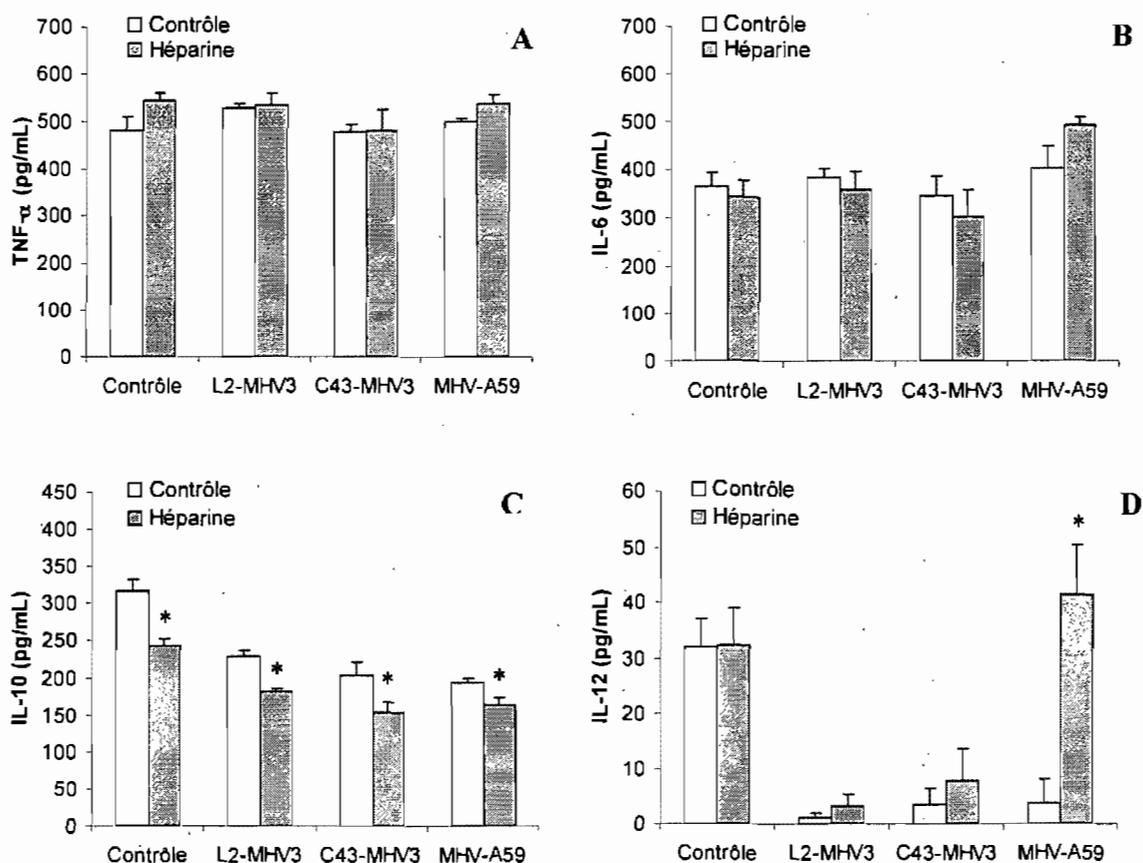


Figure 35. Production de cytokines par les macrophages de la moelle osseuse de souris *Ceacam-1a-/-* infectés en présence d'héparine.

Les cellules ont été incubées avec l'héparine à une concentration de 400 U/mL durant 1h avant l'infection avec les suspensions virales de L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 à une multiplicité d'infection de 0.01 à 0.1. Les surnageants de cellules ont été récoltés après 24h d'infection et le TNF- α (A), l'IL-6 (B), l'IL-10 (C) et l'IL-12 (D) ont été dosés par des tests ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata.

* $p < 0,05$

complètement annulé l'effet inhibiteur du virus MHV-A59, mais pas des deux autres virus, sur la production d'IL-12 par les macrophages de souris *Ceacam-1a-/-* ($p < 0,05$) (Fig. 35D).

4.2.14- Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages de moelle osseuse de souris *Ceacam-1a-/-* en présence d'un inhibiteur du TLR2

Afin de vérifier si la baisse de la production d'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages de souris *Ceacam-1a-/-* en présence des virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 pouvait aussi être médiée par les récepteurs TLR2, les cellules ont été incubées avec un inhibiteur du TLR2 préalablement à l'ajout de virus dans le milieu. Tel que montré à la figure 36A, l'inhibiteur du TLR2 a entraîné une faible baisse de la production de TNF- α chez les macrophages non-infectés ou infectés avec chacun des trois virus ($p < 0,05$). La production d'IL-6 par les macrophages contrôles a, par contre, été fortement réduite par l'ajout de l'inhibiteur du TLR2 ($p < 0,01$) (Fig. 36B). En présence des trois virus étudiés, la baisse dans la production d'IL-6 induite par l'inhibiteur du TLR2 a été moins forte que chez les cellules non-infectées ($p < 0,05$) (Fig. 36B). L'ajout de l'inhibiteur du TLR2 a réduit plus fortement la production d'IL-10 chez les macrophages non-infectés que chez les macrophages infectés ($p < 0,05$ à $0,01$) (Fig. 36C). Par contre, l'ajout de l'inhibiteur du TLR2 a augmenté la production d'IL-12 par les macrophages non-infectés et les macrophages infectés avec chacun des virus ($p < 0,05$ à $0,01$) (Fig. 36D).

4.2.15- Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages de moelle osseuse de souris *Ceacam-1a-/-* en présence d'héparine et d'un inhibiteur du TLR2

Les macrophages de souris *Ceacam-1a-/-* ont été traités avec la combinaison d'héparine et de l'inhibiteur du TLR2 et ensuite mis en contact avec les préparations virales. Une diminution générale de la production de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-10 a été observée chez les macrophages non-infectés et infectés, particulièrement pour l'IL-6 et l'IL-10 ($p < 0,05$ à $0,01$) (Fig. 37A à C). Par contre, les cellules infectées avec le virus

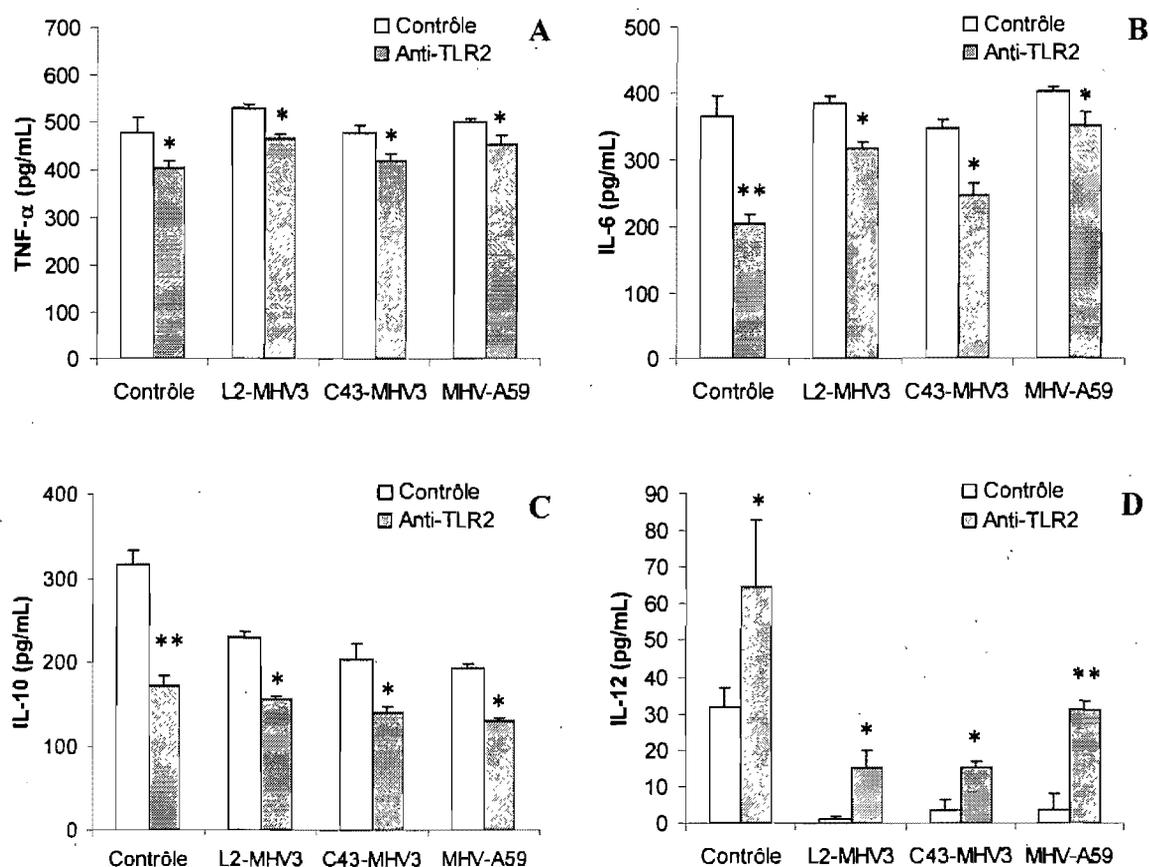


Figure 36. Production de cytokines par les macrophages de la moelle osseuse de souris *Ceacam-1a*^{-/-} infectés en présence d'un inhibiteur du TLR2.

Les cellules ont été incubées avec un inhibiteur du TLR2 à une concentration de 500ng/mL durant 1h avant l'infection avec les suspensions virales de L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 à une multiplicité d'infection de 0.01 à 0.1. Les surnageants de cellules ont été récoltés après 24h d'infection et le TNF- α (A), l'IL-6 (B), l'IL-10 (C) et l'IL-12 (D) ont été dosés par des tests ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicate. *p<0,05 **p<0,01

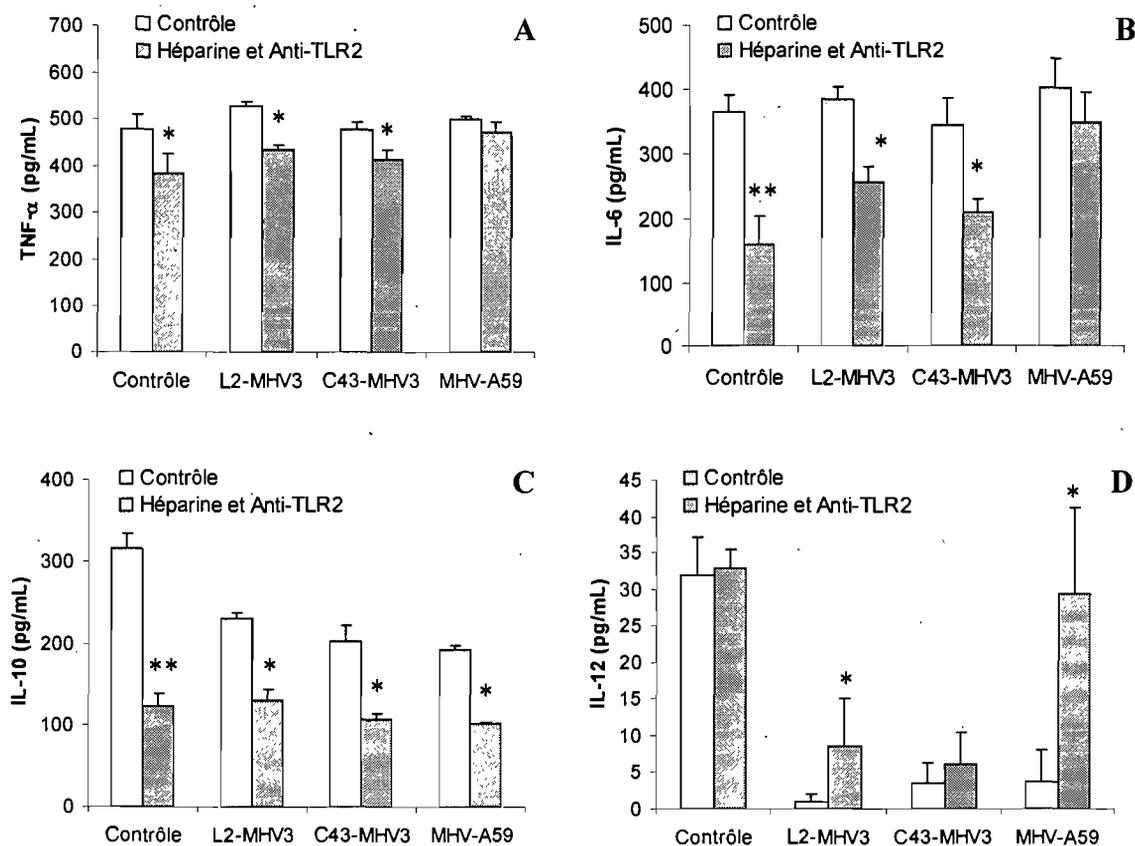


Figure 37. Production de cytokines par les macrophages de la moelle osseuse de souris *Ceacam-1a-/-* infectés en présence d'héparine et d'un inhibiteur du TLR2.

Les cellules ont été incubées avec l'héparine (400 U/mL) et un inhibiteur du TLR2 (500 ng/mL) durant 1h avant l'infection avec les suspensions virales de L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 à une multiplicité d'infection de 0.01 à 0.1. Les surnageants de cellules ont été récoltés après 24h d'infection et le TNF- α (A), l'IL-6 (B), l'IL-10 (C) et l'IL-12 (D) ont été dosés par des tests ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

MHV-A59 n'ont pas diminué leur production de TNF- α et d'IL-6 en présence d'héparine et de l'inhibiteur du TLR2. La combinaison d'héparine et d'inhibiteur du TLR2 n'a pas non plus fait varier la production d'IL-12 par les macrophages non-infectés ou en présence du virus C43-MHV3 (Fig. 37D). Une hausse de la production d'IL-12 a, par contre, été notée chez les macrophages infectés avec les virus L2-MHV3 et MHV-A59 en présence d'héparine et d'inhibiteur du TLR2 combinés ($p < 0,05$) (Fig. 37D).

4.3- Effets des macrophages infectés sur l'activité des lymphocytes

Nous avons précédemment observé que les infections *in vitro* des macrophages de souris C57BL/6 par les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 avaient induit un déficit dans la production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 alors que les mêmes infections chez les macrophages de souris SJL avaient entraîné une diminution de la production de TNF- α , d'IL-10 et d'IL-12, mais pas de celle de l'IL-6 (sections 4.2.1 à 4.2.4). Afin de vérifier si ces déficits peuvent résulter en un manque de stimulation des lymphocytes et ainsi contribuer aux immunodéficiences lymphocytaires observées lors de la maladie aiguë chez la souris susceptible ou la maladie neurologique chez la souris semi-susceptible SJL induites par le virus MHV3 (Remoli *et al.*, 2002), la capacité de prolifération et le pourcentage d'apoptose des lymphocytes en contact direct ou indirect (via le surnageant) avec des macrophages infectés ont été évalués.

4.3.1- Activité métabolique des lymphocytes de souris C57BL/6 ou SJL en contact direct ou indirect avec des macrophages infectés.

La diminution de la production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et/ou d'IL-12 après 24h par les macrophages infectés avec les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 pourrait affecter leur capacité à stimuler la prolifération des lymphocytes. Afin de vérifier cette hypothèse, des lymphocytes spléniques de souris C57BL/6 et SJL ont été mis en contact avec des macrophages de moelle osseuse syngéniques infectés, soit de façon directe par co-culture dans des puits contenant déjà les macrophages, ou indirectement en séparant les macrophages des lymphocytes via un système de godet ne permettant que le passage de substances solubles (transwell). L'activité métabolique

des lymphocytes a ensuite été évaluée par l'addition de MTS/PMS et la mesure de la densité optique à 490nm, tel que décrit dans la section matériel et méthodes.

Tel que montré dans la figure 38, l'activité métabolique des lymphocytes de souris C57BL/6 ou SJL mis en contact direct avec les macrophages non-infectés était plus élevée que celle observée lorsque mis en contact avec les substances solubles macrophagiques seulement. La présence des trois virus a favorisé une augmentation de l'activité cellulaire des lymphocytes de souris C57BL/6 en contact avec les macrophages ($p < 0,01$) (Fig. 38 A, C et E). Ainsi, la prolifération des lymphocytes de souris C57BL/6 en contact direct avec les macrophages infectés par les virus L2-MHV3, C43-MHV3 ou MHV-A59 a été augmentée de façon importante, particulièrement en comparaison avec la diminution d'activité de ces cellules lorsqu'elles étaient mises en contact indirect avec les macrophages ($p < 0,05$). Au contraire, l'activité métabolique des lymphocytes de souris SJL a été augmenté par le contact indirect avec les macrophages infectés avec les trois virus alors que seul le contact direct avec des macrophages infectés par le virus L2-MHV3 a légèrement stimulé cette activité ($p < 0,05$) (Fig. 38 B, D et F).

4.3.2- Pourcentage d'apoptose des lymphocytes de souris C57BL/6 ou SJL en contact direct ou indirect avec des macrophages infectés.

Afin de vérifier si les augmentations et diminutions d'activité métabolique des lymphocytes de souris C57BL/6 et SJL en contact direct ou indirect avec les macrophages infectés étaient reliées à une diminution ou une augmentation d'apoptose de ceux-ci, les lymphocytes ont été récoltés et marqués avec de l'iodure de propidium (IP) et de l'annexinV. Les pourcentages de cellules apoptotiques ont été mesurés chez des lymphocytes spléniques de souris C57BL/6 et SJL en contact direct ou indirect (transwell) avec des macrophages myéloïdes infectés. Les résultats montrés dans la figure 39 révèlent que les pourcentages de lymphocytes AnnexinV⁺ et/ou IP⁺ en provenance de souris C57BL/6 et SJL étaient plus faibles lorsque ces cellules étaient en contact direct avec les macrophages non-infectés, en comparaison avec les pourcentages d'apoptose des lymphocytes en contact seulement avec les substances solubles produites par les macrophages non-infectés. Toutefois, les infections virales

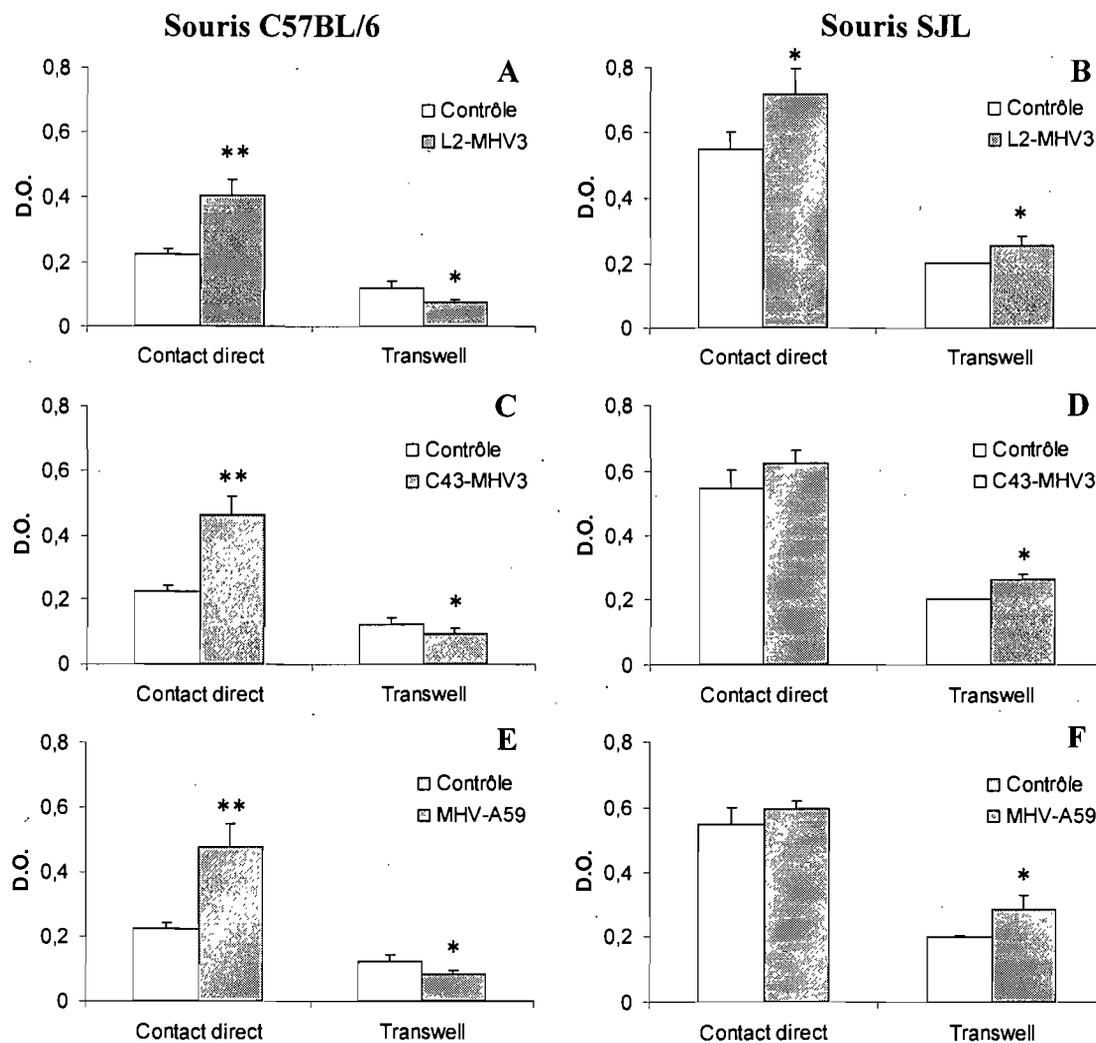


Figure 38. Activité métabolique des lymphocytes murins en contact direct ou indirect (transwell) avec des macrophages infectés.

Les macrophages de souris C57BL/6 (A, C, E) et SJL (B, D, F) ont été infectés avec des suspensions de virus L2-MHV3 (A, B), C43-MHV3 (C, D) ou MHV-A59 (E, F) à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1. Les lymphocytes syngéniques ont été ajoutés à 24h post-infection, soit directement avec les macrophages (contact direct) ou dans des godets (contact indirect). Les lymphocytes ont été récoltés après 24h de contact avec les macrophages et la capacité métabolique a été mesurée par un test MTS/PMS. Les expériences ont été effectuées en triplicata. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

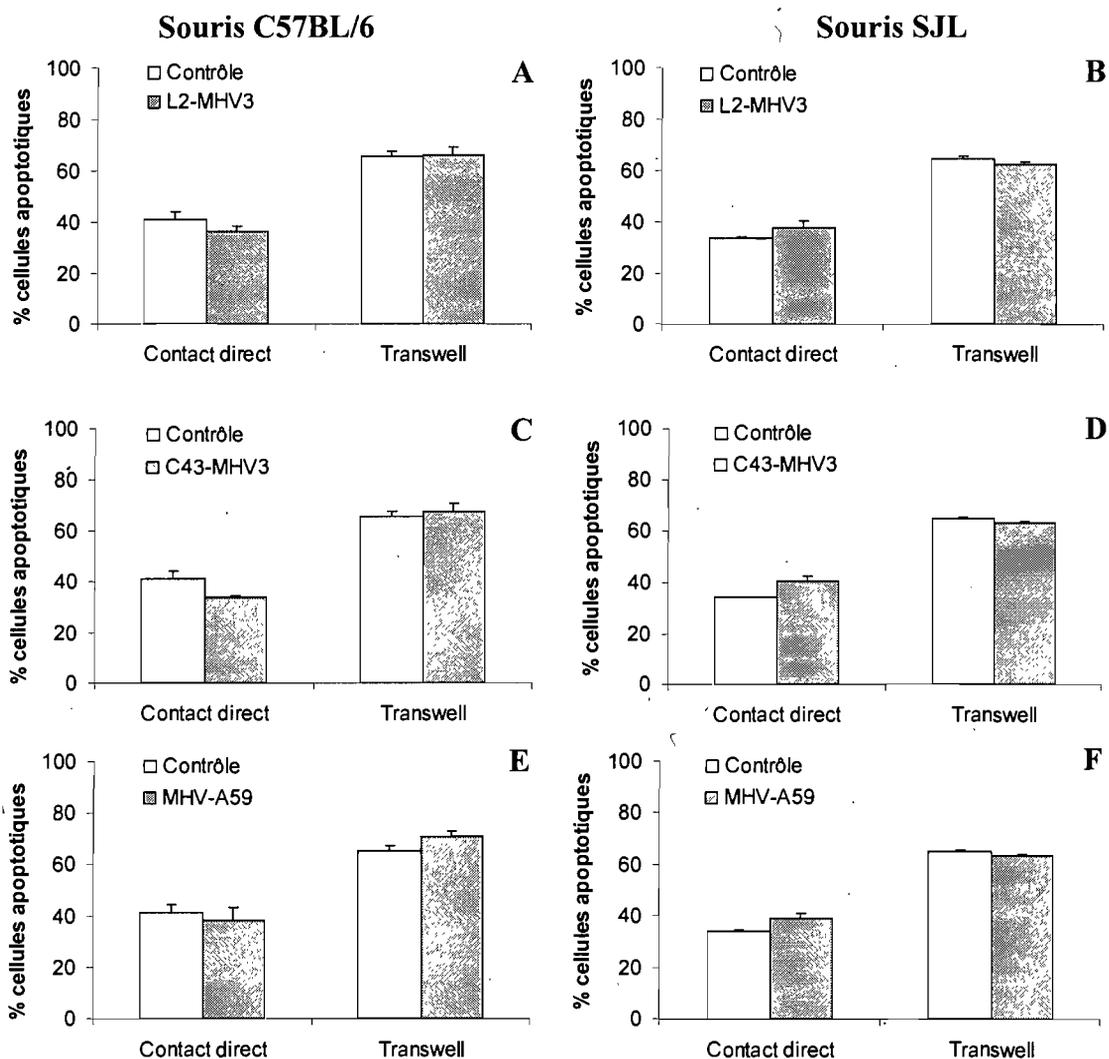


Figure 39. Apoptose des lymphocytes murins en contact direct ou indirect (transwell) avec des macrophages infectés.

Les macrophages de souris C57BL/6 (A, C, E) et SJL (B, D, F) ont été infectés avec des suspensions de virus L2-MHV3 (A, B), C43-MHV3 (C, D) ou MHV-A59 (E, F) à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1. Les lymphocytes syngéniques ont été ajoutés à 24h post-infection, soit directement avec les macrophages (contact direct) ou dans des transwells. Les lymphocytes ont été récoltés après 24h de contact direct ou indirect avec les macrophages et l'apoptose a été mesurée par un marquage AnnexinV / Iodure de propidium. Les cellules apoptotiques ont été définies comme étant AnnexinV+ et/ou IP+. Les expériences ont été effectuées en triplicata.

n'ont pas modulé les pourcentages de cellules apoptotiques chez les lymphocytes de souris C57BL/6 ou SJL en contact direct ou indirect avec les macrophages.

4.3.3- Interaction entre des macrophages myéloïdes infectés et des lymphocytes B spléniques

De faibles variations dans les pourcentages de lymphocytes apoptotiques ont été observées lorsque ces cellules étaient en co-culture avec des macrophages de souris C57BL/6 et SJL infectés par les différents virus. Les niveaux plus élevés d'apoptose dans la culture des lymphocytes en godets (transwell) suggèrent que ces faibles variations étaient reliées au contact avec les macrophages plutôt qu'à la production de cytokines. Afin de vérifier cette hypothèse, des co-cultures de lymphocytes spléniques en contact direct avec les macrophages infectés ont été réalisées et les lymphocytes ont été immunomarqués avec des anticorps anti-MHV3, anti-Mac-1 et anti-IgM, anti-TCR β ou anti-NK1.1 lors de trois différents triples immunomarquages. Les cellules immunomarquées ont été analysées en microscopie confocale.

L'analyse globale des préparations montre que les lymphocytes non-infectés ne se retrouvent généralement pas en contact avec les macrophages infectés (résultats non-montrés). Par contre, seuls les lymphocytes B se sont retrouvés en contact avec les macrophages infectés et exprimaient des protéines virales. Les cellules NK étaient rarement observées et les lymphocytes T n'étaient pas associés aux macrophages.

Les lymphocytes B et les cellules NK, mais non pas les lymphocytes T, sont normalement permissifs à l'infection virale avec les virus L2-MHV3 et C43-MHV3. Les lymphocytes B constituaient près de 50% des cellules présentes dans la suspension de lymphocytes spléniques alors que les cellules NK étaient en faible quantité (moins de 5%), le reste étant constitué des différentes sous-populations de lymphocytes T. Tel que montré dans la figure 40, les lymphocytes B en contact avec des macrophages infectés provenant des souris C57BL/6 étaient permissifs aux virus L2-MHV3 et C43-MHV3 (Fig. 40A et D). Ces images montrent que les macrophages infectés étaient très gros et s'apparentaient à des syncytia. Les lymphocytes B de souris SJL n'étaient pas permissifs aux deux virus et étaient peu associés à des

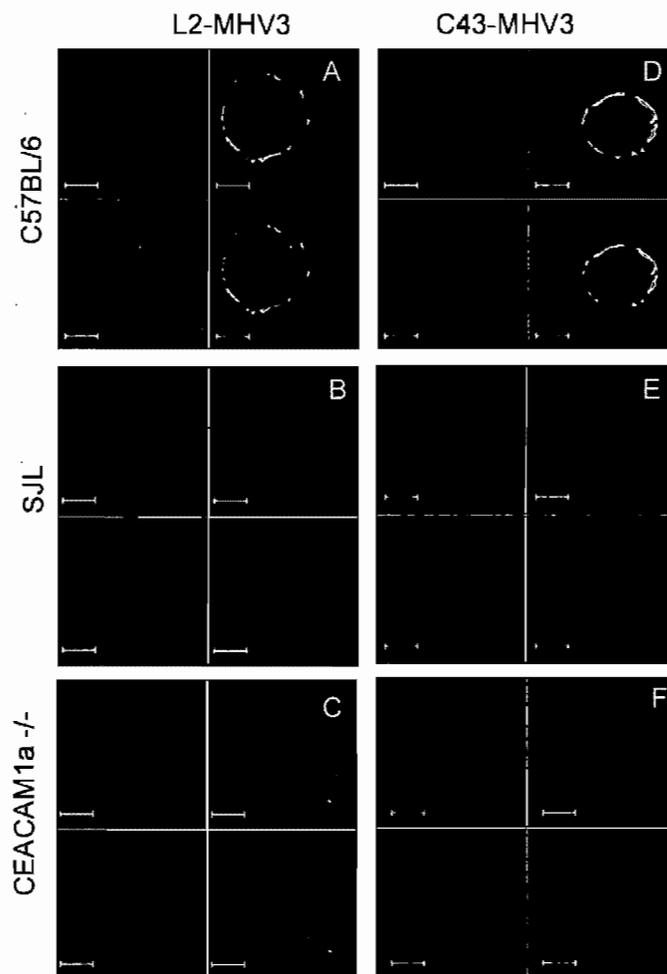


Figure 40. Interactions entre des lymphocytes B murins et des macrophages syngéniques infectés.

Les macrophages myéloïdes en provenance de souris C57BL/6 (A et D), SJL (B et E) et *Ceacam-1a* $-/-$ (C et F) ont été infectés durant 24 h avec 0.1 à 1 m.o.i. de virus L2-MHV3 (A, B et C) ou C43-MHV3 (D, E et F) et des lymphocytes syngéniques ont été ajoutés. Les cellules ont été récoltées après 24 h et ont été colorées pour la microscopie confocale. Pour chacune des images, le carré supérieur gauche représente le marquage avec l'anticorps anti-IgM couplé au PerCP-Cy5.5, le carré supérieur droit représente le marquage avec l'anticorps anti-MHV3 et un anti-IgG couplé au Cy3, le carré inférieur gauche représente le marquage avec l'anticorps Anti-Mac-1 couplé au FITC et le carré inférieur droit est une image superposée des trois différents marquages. Les résultats sont représentatifs de triplicata.

macrophages, ce que révèlent les photos B et E de la même figure. La faible quantité de protéines virales détectée à la surface des cellules de souris *Ceacam-1a-/-* suggère que les protéines virales puissent se fixer à la surface cellulaire par d'autres récepteurs que le CEACAM-1, tels les TLR2 ou les régions héparanes sulfates (Fig. 40 C et F).

5- DISCUSSION

5.1- Cellules endothéliales

Nous avons montré, au cours de ce travail, que les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique étaient permissives aux virus MHV, mais que cette permissivité était différente selon les virus étudiés. De plus, les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 affectaient différemment les propriétés inflammatoires des cellules endothéliales cérébrales en fonction de leur permissivité, de la nature du récepteur viral CEACAM-1 et de leur sensibilité aux effets du TNF- α .

5.1.1- Permissivité des cellules endothéliales

Le virus L2-MHV3 s'est répliqué à un titre élevé dans les cellules endothéliales cérébrales de souris C57BL/6 cultivées *in vitro* et son variant C43-MHV3, provenant d'une infection persistante dans le SNC (Lamontagne *et al.*, 1990), a induit une infection productive plus faiblement, alors que le virus MHV-A59 n'a pas entraîné la production de virions infectieux à un niveau détectable (Fig. 5). Par contre, la réplication virale n'a pas été associée à l'apparition d'effets cytopathiques et de syncétium, et la production de virions infectieux pouvait aller au-delà de 10 jours, suggérant plutôt le développement d'une infection persistante. Les virus MHV3 peuvent induire des infections persistantes *in vivo* dans le SNC (Tardieu *et al.*, 1986), d'où origine d'ailleurs le variant C43-MHV3. Par contre, les mécanismes responsables de la persistance virale dans le SNC n'avaient pas été identifiés. Nos résultats sur la permissivité des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique suggèrent que la persistance du virus dans le SNC pourrait résulter de sa production continue dans ces cellules. De plus, nos résultats confirment les travaux sur la résistance des cellules cérébrales à l'infection par le MHV-A59, où il a été observé que les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique ne supportaient pas l'infection par ce virus (Godfraind et Coutelier, 1998). Par contre, la permissivité des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique aux infections par les virus MHV3 est rapportée ici pour la première fois, même s'il était connu que le virus MHV3 pouvait se répliquer dans le SNC de souris (Tardieu *et al.*, 1986). La permissivité des cellules endothéliales cérébrales aux virus L2-MHV3 et C43-MHV3 pourrait favoriser l'entrée du virus dans le cerveau de la même façon que la capacité du virus de la rougeole à

infecter ces cellules entraînerait l'entrée de ce virus dans le cerveau de la majorité des patients infectés (Carsillo *et al.*, 2006). Toutefois, la permissivité des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique à un virus n'est pas une condition essentielle à sa capacité à se propager dans le SNC, comme en témoigne l'encéphalite virale induite par le MHV-A59. Puisque les macrophages sont une cible importante de l'infection par le virus MHV-A59 (Wijburg *et al.*, 1997), cette voie pourrait être celle privilégiée par ce virus pour atteindre le SNC. Les travaux portant sur l'entrée du VIH dans le SNC ont permis de mettre en évidence des mécanismes d'entrée des virus dans le SNC via leur transport à l'intérieur de lymphocytes ou de monocytes/macrophages infectés (Kramer-Hammerle *et al.*, 2005).

L'infection différentielle des cellules endothéliales cérébrales par les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 et la persistance virale pourraient être reliées à leur capacité d'induction de la production d'IFN- α , puisque cette cytokine possédant une importante activité antivirale est impliquée dans la résistance innée contre les virus et favorise la persistance virale (Takaoka et Yanai, 2006). Nous avons observé chez la souris C57BL/6 que le fort titre viral induit par le virus L2-MHV3 coïncidait avec l'incapacité des cellules endothéliales cérébrales à augmenter leur production d'IFN- α en présence de ce virus. Quant au virus C43-MHV3, il a provoqué une augmentation de la sécrétion d'IFN- α par les cellules endothéliales cérébrales en culture à 48h et 144h p.i., mais pas à 96h p.i., ce qui corrélait également avec le titre viral. En effet, la diminution de la production d'IFN- α par les cellules endothéliales cérébrales à 96h p.i. était associée à une augmentation de plus de 10 fois du titre viral du C43-MHV3 entre 48h et 96h, alors qu'à 144h p.i., lorsque la production d'IFN- α par les cellules endothéliales avait à nouveau été stimulée, le titre viral a diminué plus que de moitié. Par contre, l'absence de virus MHV-A59 infectieux n'était pas en lien avec une forte production d'IFN- α puisque cette cytokine n'a été induite qu'à 216h et 312h p.i.; bien que le titre viral du MHV-A59 était déjà indétectable à 48h p.i. (Fig. 6). Ainsi, la non-permissivité des cellules endothéliales cérébrales à l'infection par le MHV-A59 ne serait pas provoquée par l'induction d'IFN- α . Au-delà de son effet antiviral direct, l'induction de la production d'IFN- α est importante dans la défense antivirale par sa capacité à activer les cellules adjacentes, les cellules effectrices du système

immunitaire ainsi qu'à induire le développement d'une réponse immunitaire adaptative (Mogensen et Paludan, 2005). Une production insuffisante d'IFN- α en réponse aux virus pourrait ainsi être partiellement responsable de la faiblesse de la réponse immunitaire contre ces virus.

5.1.2- Anomalies fonctionnelles des cellules endothéliales infectées avec les différents virus

La permissivité des cellules endothéliales cérébrales à l'infection par les virus MHV3 peut être mise en relation avec des anomalies fonctionnelles. La production d'IL-6 par les cellules endothéliales cérébrales infectées par les trois souches virales s'est avérée être en relation inverse avec la permissivité des cellules à l'infection par ces trois souches. Parmi les virus étudiés, le virus pathogène L2-MHV3 a provoqué une baisse de production d'IL-6 au début et une faible stimulation très tardivement, alors que le virus MHV-A59 est celui qui a entraîné la plus forte production d'IL-6 par les cellules endothéliales de 44h à 236h p.i. et que le virus C43-MHV3 n'a entraîné aucune variation de production d'IL-6 à 44h p.i., mais a induit une production modérée d'IL-6 ensuite (Fig. 7).

Cette relation inverse a aussi été observée au niveau de la production de PGE₂ par les cellules endothéliales de souris C57BL/6 à 96h p.i. Alors que le virus L2-MHV3 induisait une diminution de la production de PGE₂ chez les cellules endothéliales de souris C57BL/6, le virus MHV-A59 stimulait la production de cette cytokine. Quant au virus C43-MHV3, il n'a provoqué aucun changement significatif par rapport à la production basale de PGE₂ (Fig. 8). Il semble donc que la capacité des virus MHV à se reproduire dans les cellules endothéliales cérébrales entraîne une diminution proportionnelle dans la production d'IL-6 et de PGE₂ en fonction du titre viral. Cette diminution pourrait provenir d'une diminution de cellules viables suite à un processus d'apoptose, ou plutôt d'une inhibition des voies de signalisation impliquées dans la production de ces cytokines, mais ces hypothèses n'ont pas été vérifiées dans le cadre de ce mémoire.

D'autre part, nos résultats ainsi que les travaux de Godfraind et Coutelier (1998) suggèrent que les cellules endothéliales cérébrales seraient non-permissives à

l'infection par le virus MHV-A59, il est donc surprenant que ce virus induise aussi fortement la production d'IL-6 et de PGE₂ chez ces cellules. Toutefois, il a été démontré par Joseph et ses collègues (1993) que le virus MHV-JHM inactivé par rayonnement ultraviolet induisait la production d'IL-6 chez les cellules endothéliales de souris SJL. Le virus étant inactivé, cette production d'IL-6 serait donc indépendante de l'infection virale. Le virus pourrait potentiellement induire la production d'IL-6 et de PGE₂ via des interactions avec d'autres récepteurs, tel que le récepteur TLR2, puisqu'il a été démontré que plusieurs virus de différentes familles pouvaient interagir avec le TLR2 et induire la production de cytokines (Bieback *et al.*, 2002; Compton *et al.*, 2003; Kurt-Jones *et al.*, 2004).

Le virus MHV-A59 est le seul à avoir provoqué une augmentation de la production d'IL-10. Cette augmentation a été transitoire à 144h p.i. (Fig. 9). La production d'IL-10 est nécessaire pour réduire l'amplitude de la réponse inflammatoire et limiter les dommages potentiels causés par l'inflammation dans le SNC (Vitkovic *et al.*, 2001). Alors qu'une production élevée d'IL-6 pourrait être bénéfique puisque l'IL-6 est impliquée dans la vasculogénèse, des niveaux élevés et non contrôlés de PGE₂ pourraient être associés à des dommages cérébraux via l'augmentation de la perméabilité vasculaire favorisant l'influx de cellules immunitaires dans le SNC (Fee *et al.*, 2000; Trickler *et al.*, 2005). L'augmentation d'IL-10 par les cellules endothéliales en contact avec le MHV-A59 pourrait donc constituer un mécanisme de régulation déclenché en réponse à la forte production de PGE₂ induite par le MHV-A59, puisque l'IL-10 inhibe la production de PGE₂ par les cellules endothéliales cérébrales (Guo *et al.*, 2006).

5.1.3- Effets du récepteur CEACAM-1a sur la permissivité des cellules endothéliales à l'infection virale et sur la production de cytokines

Le récepteur CEACAM-1a constitue le principal récepteur pour la fixation et l'entrée des virus MHV dans la cellule-cible (Hemmila *et al.*, 2004; Nakagaki *et al.*, 2005). Effectivement, les virus L2-MHV3 et C43-MHV3 se sont répliqués dans les cellules endothéliales de souris C57BL/6 exprimant le récepteur CEACAM-1a.

Par contre, aucun des trois virus étudiés ne s'est répliqué à un titre détectable dans les cultures de cellules endothéliales de souris SJL exprimant le CEACAM-1b. Les mécanismes par lesquels les cellules endothéliales de souris SJL ne supportent pas l'infection par les virus MHV3 pourraient être en relation avec la nature du récepteur CEACAM-1b, qui ne favorise pas la fixation de la protéine S du virus (Virelizier et Allison, 1976). Par contre, bien que les cellules endothéliales cérébrales de souris SJL ne supportent pas la réplication virale, il n'en reste pas moins que ces souris sont susceptibles à l'infection du SNC par les virus MHV3 *in vivo* (Tardieu *et al.*, 1986). Il est possible qu'une très faible quantité de virions infectieux puissent être constamment produits par les cellules endothéliales cérébrales de souris SJL infectées par les virus MHV3 via le récepteur CEACAM-1b, ce qui suppose une faible interaction avec ce récepteur. Cette faible réplication limiterait la réponse immunitaire contre ces cellules et favoriserait une infection chronique du SNC. Il est aussi possible que les virus MHV3 puissent utiliser un autre récepteur pour établir leur réplication, comme il a été observé pour des variants du virus MHV-A59 (de Haan *et al.*, 2005). D'autre part, l'inhibition de la production d'IFN- α par les trois virus chez les cellules endothéliales de souris SJL après 96h d'infection (Fig. 10) suggère la présence des premières étapes de la réplication virale. Cette inhibition aurait également pu être causée par l'interaction de composants viraux avec des récepteurs cellulaires malgré l'absence de réplication virale, ce qui expliquerait que l'inhibition de la production d'IFN- α par les virus n'ait entraîné aucune augmentation de la réplication virale à des niveaux détectables pour aucun des virus. Compte tenu de l'importance de l'IFN- α dans la réponse antivirale, plusieurs virus possèdent des protéines qui bloquent la production d'IFN- α (Hengel *et al.*, 2005). Il ne serait donc pas étonnant que ce soit également le cas pour les virus MHV, mais il n'y a pas d'informations à ce sujet.

Le rôle majeur du récepteur CEACAM-1a dans la permissivité des cellules endothéliales aux infections par les virus MHV a été mis en évidence grâce à l'utilisation des cellules endothéliales de souris *Ceacam-1a*^{-/-}. Il a été démontré que cette lignée murine était résistante à l'infection *in vivo* par le virus MHV-A59 (Hemmila *et al.*, 2004). Ainsi, il n'est pas surprenant que le virus MHV-A59 ne se soit pas répliqué à un niveau détectable dans les cultures de cellules endothéliales de souris

Ceacam-1a^{-/-}. Contrairement au virus MHV-A59, nos résultats indiquent que les virus L2-MHV3 et C43-MHV3 se sont répliqués à un niveau détectable dans les cultures de cellules endothéliales de souris *Ceacam-1a*^{-/-} (Fig. 13), suggérant que les virus L2-MHV3 et C43-MHV3 ont acquis la capacité d'utiliser un autre récepteur que le CEACAM-1 pour entrer dans les cellules endothéliales et se répliquer. Il est possible que le récepteur héparane sulfate puisse jouer ce rôle, mais cette hypothèse n'a pas été spécifiquement vérifiée. Il a été rapporté que le virus MHV-A59 ayant acquis des mutations de la protéine S pouvait utiliser l'héparane sulfate comme récepteur d'entrée cellulaire dans des cultures cellulaires infectées de manière persistante (de Haan *et al.*, 2005). De plus, une étude récente a démontré que les souris *Ceacam-1a*^{-/-} étaient susceptibles à l'infection par le coronavirus MHV-JHM (Miura *et al.*, 2008).

La présence des différents virus dans les cellules endothéliales en culture a induit des modifications importantes dans la production de cytokines par ces cellules. Les niveaux d'IL-6 basaux des cellules endothéliales de souris C57BL/6 étaient plus de 20 fois supérieurs à ceux des souris SJL. De plus, l'infection des cellules endothéliales cérébrales de souris C57BL/6 par le virus MHV-A59 a entraîné une forte induction de la production d'IL-6 entre 44h et 120h p.i., alors qu'aucune induction d'IL-6 n'a été observée à 96h p.i. chez les cellules endothéliales de souris SJL infectées par ce même virus (Figs. 7 et 11). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Joseph et ses collègues (1993) dans une étude portant sur l'induction de la production d'IL-6 par les cellules endothéliales cérébrales exposées au virus MHV-JHM, où ils ont montré que les cellules endothéliales de souris BALB/c (qui expriment le gène *Ceacam-1a*) produisaient jusqu'à 16 fois plus d'IL-6 en réponse au MHV-JHM que les cellules endothéliales de souris SJL, pour lesquelles seule une réponse minimale avait été induite en comparaison avec les niveaux basaux. Les niveaux d'IL-6 produits par les cellules endothéliales cérébrales de souris *Ceacam-1a*^{-/-} étaient également beaucoup plus élevés que ceux des cellules de souris SJL. Toutefois, les trois virus étudiés ont induit une diminution importante de la production d'IL-6 par ces cellules (Fig. 14). Cette diminution dans la production d'IL-6 suite à l'infection des cellules endothéliales par les différents virus suggère que les virus peuvent activer une voie de signalisation qui interfère avec la production d'IL-6 indépendamment de la présence de la molécule

CEACAM-1a ou, que la réplication virale observée dans ces cellules, même faible, pourrait entraîner une mortalité cellulaire.

De façon similaire, les niveaux basaux de PGE₂ produits par les cellules endothéliales cérébrales de souris C57BL/6 étaient également supérieurs à ceux des cellules de souris SJL, alors que les cellules endothéliales de souris *Ceacam-1a*^{-/-} ont produit beaucoup plus de PGE₂ que les cellules endothéliales des deux autres souches murines (Figs. 8, 12 et 15). Ces données concordent avec les résultats d'une récente étude dans laquelle il a été montré que le récepteur CEACAM-1 agissait comme un inhibiteur de la sécrétion de cytokines chez les lymphocytes T murins (Nagaishi *et al.*, 2006). L'infection des cellules endothéliales de souris C57BL/6 avec les virus L2-MHV3 et C43-MHV3 inhibait la production de PGE₂, alors que le virus MHV-A59 induisait une augmentation de la PGE₂, suggérant que la réplication virale plus élevée des virus MHV3 pourrait être impliquée dans l'inhibition de la production de PGE₂ (Fig. 8). Malgré l'absence d'effets cytopathiques et de mortalité cellulaire dans les cultures de cellules endothéliales infectées, la réplication virale des virus MHV3 pourrait interférer dans le mécanisme de production basale de cytokines. Il a été montré que la réplication virale nécessitait la voie de signalisation p38 MAPK et cette voie peut aussi être impliquée dans la production de l'IL-6 et, indirectement, de la PGE₂ (Banerjee *et al.*, 2002; Rummel *et al.*, 2006). Dans les cultures de cellules endothéliales de souris SJL infectées par les trois virus, où aucune réplication virale n'avait été détectée, aucun des trois virus étudiés n'a modulé significativement la production de PGE₂ (Fig. 12). Par contre, les virus C43-MHV3 et MHV-A59, mais non pas le virus L2-MHV3, ont inhibé la production de PGE₂ par les cellules endothéliales de souris *Ceacam-1a*^{-/-} de 24h à 120h (Fig. 15). Ces résultats suggèrent que la fixation des virus C43-MHV3 et MHV-A59 à un autre récepteur que le CEACAM-1 pourrait être impliquée dans l'inhibition de la production de PGE₂, du moins chez les cellules endothéliales de souris *Ceacam-1a*^{-/-}. Il est possible que ce récepteur ne soit pas présent chez les cellules de souris SJL.

5.1.4- Effets des récepteurs TLR2 et héparanes sulfates des cellules endothéliales sur la production de cytokines

L'héparane sulfate est un candidat pour un récepteur alternatif tel que montré avec des variants du virus MHV-A59 et du coronavirus aviaire (de Haan *et al.*, 2005; Madu *et al.*, 2007). L'ajout d'héparine ou d'un anticorps dirigé contre le TLR2 dans les cultures de cellules endothéliales cérébrales de souris C57BL/6 a provoqué une très forte inhibition de la production d'IL-6 en absence et en présence de virus, bien que le niveau d'IL-6 soit demeuré légèrement plus élevé chez les cellules infectées que chez les cellules contrôles (Figs. 16 et 17). Ainsi, la stimulation de la production d'IL-6 observée après 12h de culture avec les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 et après 24h avec les virus L2-MHV3 et C43-MHV3 pourrait être due à la fixation du virus sur les récepteurs TLR2 ou des régions héparanes sulfates de la surface cellulaire. L'ajout d'héparine ou d'un anticorps anti-TLR2 a entraîné une diminution de la production d'IL-6 par les cellules endothéliales, suggérant que l'induction d'IL-6 suite aux infections virales pourrait dépendre de ces récepteurs. Ainsi, la baisse de production d'IL-6 par les cellules endothéliales cérébrales en présence d'héparine pourrait être causée par l'inhibition du facteur nucléaire NF- κ B, qui est impliqué dans la production d'IL-6, puisqu'il a été récemment démontré dans une lignée cellulaire de cellules endothéliales cérébrales murines que l'héparine pouvait empêcher la fixation du NF- κ B à l'ADN dans le noyau cellulaire (Lee *et al.*, 2007). D'autre part, l'inhibition presque totale de la production basale d'IL-6 par les cellules endothéliales suite au blocage des récepteurs TLR2 suggère que des molécules présentes dans le milieu de culture puissent induire cette production basale d'IL-6 via leur fixation au TLR2. Ces molécules pourraient être des protéines cellulaires provenant du surnageant de cellules L2 non-infectées, qui a été utilisé comme surnageant contrôle, puisque les virus sont produits sur ces cellules. En effet, il a été démontré que le TLR2 pouvait reconnaître certaines protéines cellulaires (Takeda et Akira, 2004a). Cette hypothèse est supportée par le fait que le niveau basal de production d'IL-6 était plus faible lorsque les cellules endothéliales étaient seulement en présence du milieu de culture (résultats non-montrés).

5.1.5- Effets de la stimulation par le TNF- α sur la production d'IL-6 et de PGE₂ par les cellules endothéliales

Verma et ses collègues (2006) ont démontré que le TNF- α était peu produit par les cellules endothéliales cérébrales de souris en culture, même en réponse au LPS. Par contre, c'est la principale cytokine produite par les macrophages périphériques en réponse aux infections virales (Konsman *et al.*, 2007). Ainsi, l'infection des cellules endothéliales cérébrales par les virus MHV3 pourrait entraîner *in vivo* un recrutement de macrophages produisant du TNF- α . L'effet du TNF- α sur les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique a été évalué dans le contexte de l'infection par les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59. Nous avons montré que seules les plus fortes concentrations de TNF- α ajoutées induisaient une augmentation de la production de PGE₂ par les cellules endothéliales cérébrales de souris C57BL/6 et SJL, alors que l'augmentation de la production de PGE₂ par les cellules endothéliales de souris *Ceacam-1a*^{-/-} était proportionnelle à la concentration de TNF- α ajoutée (Figs 19, 21 et 23). Il est connu que les cellules endothéliales cérébrales répondent au TNF- α par la sécrétion de PGE₂ (Cao *et al.*, 1998; Trickler *et al.*, 2005). L'absence de réponse aux plus faibles concentrations de TNF- α chez les cellules de souris C57BL/6 ou SJL possédant le gène *Ceacam-1a* ou *1b* pourrait être dû à l'effet inhibiteur de la molécule CEACAM-1a ou 1b, puisque le TNF- α stimulait plus fortement la production de PGE₂ chez les cellules provenant de souris *Ceacam-1a*^{-/-}. Il a été récemment montré que la molécule CEACAM-1 exprimait un domaine intracellulaire long avec deux domaines ITIM qui, lorsqu'activés, entraînait une diminution dans la production de cytokines induites par les voies de signalisation Jun kinase (JNK) et ERK kinase, mais non pas via la p38 (Nagaishi *et al.*, 2006).

Nos résultats montrent que le virus MHV-A59, mais pas les virus L2-MHV3 et C43-MHV3, a inhibé la production de PGE₂ par les cellules endothéliales de souris C57BL/6 avec les plus fortes concentrations de TNF- α . De plus, les trois virus étudiés ont diminué la production de PGE₂ par les cellules endothéliales de souris SJL et *Ceacam-1a*^{-/-} aux plus fortes concentration de TNF- α . D'après une étude réalisée par Trickler et ses collègues (2005) la sécrétion de PGE₂ par les cellules endothéliales cérébrales en réponse au TNF- α serait considérablement diminuée en présence de

différents inhibiteurs du NF- κ B, suggérant un rôle pour ce facteur de transcription dans la production de PGE₂ induite par le TNF- α . De la même façon, la diminution de la sécrétion de PGE₂ par les cellules endothéliales cérébrales en réponse au TNF- α en présence des virus MHV pourrait être due à un effet inhibiteur induit par l'infection virale sur le NF- κ B, puisqu'il a récemment été démontré que les niveaux de NF- κ B étaient diminués et que les niveaux de I κ B (un inhibiteur du NF- κ B) étaient augmentés dans les cellules infectées par le MHV-A59 (Versteeg *et al.*, 2006). Ces observations suggèrent que la stimulation par le TNF- α peut compenser la diminution de la PGE₂ induite par les infections virales, qui n'est demeurée évidente qu'en présence des faibles concentrations de TNF- α .

Comme pour la PGE₂, l'ajout de TNF- α a aussi stimulé la production d'IL-6 par les cellules endothéliales des trois souches de souris, surtout chez les souris *Ceacam-1a*^{-/-} (Figs 18, 20 et 22). Les virus étudiés n'ont eu que très peu d'effet sur la production d'IL-6 des cellules endothéliales de souris C57BL/6 induite par le TNF- α . Par contre, ils ont fortement stimulé la production d'IL-6 par les cellules endothéliales de souris SJL aux plus fortes concentrations de TNF- α et, au contraire, ils ont inhibé la production d'IL-6 par les cellules endothéliales de souris *Ceacam-1a*^{-/-} aux plus faibles concentrations de TNF- α , alors qu'ils n'ont plus eu d'effet aux plus fortes concentrations testées. Ainsi, il est possible que la réplication virale chez les cellules endothéliales de souris C57BL/6 puisse altérer la principale voie de signalisation impliquée dans la production d'IL-6, mais que la fixation du TNF- α à son récepteur puisse stimuler cette voie de signalisation. À l'instar de la PGE₂, l'IL-6 peut être sous le contrôle du facteur de transcription NF- κ B (Versteeg *et al.*, 2006), cette voie pouvant être induite via les TLR (Konat *et al.*, 2006).

5.2- Macrophages myéloïdes

Le rôle stimulateur du TNF- α sur la production de cytokines par les cellules endothéliales cérébrales suggèrent que la présence de macrophages activés et infectés provenant de la moelle osseuse pourraient jouer un rôle dans le fonctionnement erroné de la barrière hémato-encéphalique. Aussi, les cellules de la microglie du SNC possèdent des caractéristiques et des propriétés apparentées à celles des macrophages dans la moelle osseuse (Raivich et Banati, 2004). Donc, l'étude de la modulation des propriétés inflammatoires des macrophages myéloïdes par les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 a permis, dans un premier temps, de mieux comprendre les mécanismes par lesquels ces virus induisent des immunodéficiences dans la moelle osseuse et, dans un second temps, de cibler des effets potentiels des virus sur les propriétés des cellules de la microglie, qui devront être vérifiés par la suite directement sur ces cellules.

5.2.1- Effets de la molécule CEACAM-1 dans la production de cytokines par les macrophages avec les différents virus

Alors que la production d'IL-10 et d'IL-12 a été inhibée chez les macrophages myéloïdes des souris C57BL/6, SJL et *Ceacam-1a*^{-/-} infectés par les trois virus testés, la production de TNF- α a été inhibée par les trois virus seulement chez les cellules des souris C57BL/6 et SJL (Figs. 24, 26 et 27). La production d'IL-6 a été inhibée par les trois virus chez les cellules des souris C57BL/6 uniquement (Fig. 25). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la production de TNF- α par les virus MHV pourrait être associée à la présence des molécules CEACAM-1a (C57BL/6) ou 1b (SJL), alors que l'inhibition de la production d'IL-6 par ces virus pourrait ne dépendre que de la présence de l'allèle *Ceacam-1a*. Cette dernière hypothèse a été vérifiée en incubant les macrophages myéloïdes avec un anticorps AgB10 spécifique à la molécule CEACAM-1a. La présence de l'anticorps AgB10 n'a pas contrecarré l'inhibition de la production d'IL-6 par les macrophages infectés, ni l'inhibition de la production de TNF- α ou d'IL-10 (Fig. 28). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la production du TNF- α , de l'IL-6 ou de l'IL-10 ne passe probablement pas via la molécule CEACAM-1a. Considérant qu'il a été montré que la fixation de la glycoprotéine S du virus MHV3 sur

la molécule CEACAM-1a inhibait différentes fonctions des lymphocytes T via l'activation de la voie de signalisation SHP-1 (Boulton et Gray-Owen, 2002), cette hypothèse pourrait être renforcée par l'ajout d'un inhibiteur du SHP-1 (Nagaishi *et al.*, 2006), qui ne devrait pas non plus moduler ces inhibitions induites par les virus. Par contre, l'ajout de l'anticorps AgB10 a partiellement annulé l'inhibition de la production d'IL-12 par le virus L2-MHV3, suggérant un rôle de la molécule CEACAM-1a et/ou de l'infection virale dans l'inhibition de la production de cette cytokine par ce virus, mais non pas par les virus C43-MHV3 et MHV-A59. Il est possible que d'autres récepteurs de la surface cellulaire, tels que les TLR2 ou les régions riches en héparanes sulfates, qui ont déjà été identifiés comme des cibles pour les virus MHV ou d'autres virus, soient impliqués (Bieback *et al.*, 2002; Compton *et al.*, 2003; de Haan *et al.*, 2005).

5.2.2- Effets des récepteurs TLR2 et héparanes sulfates sur la production de cytokines par les macrophages infectés

L'implication des régions riches en héparanes sulfates et des récepteurs TLR2 dans les effets inhibiteurs observés chez les macrophages infectés a été évaluée en infectant ces cellules en présence d'héparine et/ou d'un inhibiteur du TLR2. Nos résultats ont montré que l'ajout d'héparine, d'un inhibiteur du TLR2 ou les deux ensemble n'ont pas empêché la diminution de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-10 induite par les différents virus (Figs. 29 à 37). Au contraire, une inhibition additive a plutôt été observée surtout chez les macrophages myéloïdes de souris C57BL/6. Ces résultats indiquent que la chute de cytokines induite par les virus MHV n'est pas reliée à la fixation de protéines virales sur des récepteurs héparanes sulfates ou TLR2 puisque cet effet n'est pas inhibé en présence d'antagonistes. Il a été montré que la capsid du virus de l'hépatite humaine de type B pouvait se fixer aux protéoglycanes héparanes sulfates à la surface des macrophages humains et entraîner la production de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-12 (Cooper *et al.*, 2005). Cette stimulation était reliée à l'activation du NF- κ B et des MAPK p38 et ERK suite à la co-fixation de la capsid virale avec une molécule de TLR et/ou de CD14. L'ajout d'héparine diminuait la production de ces cytokines en réduisant l'activation du NF- κ B. Même si des coronavirus peuvent utiliser des héparanes sulfates comme récepteurs, nos résultats indiquent que les virus

MHV3 ne possèdent pas la capacité d'induire des cytokines via ces récepteurs. Il est possible que la chute de cytokines soit plutôt reliée à l'infection des macrophages et à un processus viral d'apoptose entraînant indirectement la chute des cytokines. Par contre, les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 contrecarrent l'effet inhibiteur de l'héparine chez les macrophages myéloïdes de souris SJL, alors que l'ajout d'un inhibiteur du TLR2 aggrave la baisse de cytokines induite par les virus. Il n'est pas alors nécessaire que les cellules de souris SJL supportent une infection virale pour affecter les niveaux de cytokines.

Nos résultats ont montré que seule l'inhibition de la production d'IL-12 par les macrophages myéloïdes infectés par le L2-MHV3, le C43-MHV3 ou le MHV-A59 selon le cas a été partiellement ou totalement annulée par l'ajout d'héparine et/ou d'inhibiteur du TLR2, quoique cet effet différerait selon la souche murine. Selon nos résultats, l'inhibition de la production d'IL-12 par les macrophages myéloïdes de souris *Ceacam-1a-/-* en présence du virus MHV-A59 impliquerait les régions cellulaires riches en héparanes sulfates. Ces régions seraient également partiellement engagées dans l'inhibition de la production d'IL-12 par les macrophages de souris C57BL/6 infectés par le virus L2-MHV3 et les macrophages de souris SJL infectés par les virus C43-MHV3 et MHV-A59. Les récepteurs TLR2 ont semblé peu impliqués, sauf dans l'inhibition de la production d'IL-12 par les macrophages de souris C57BL/6 infectés par le virus L2-MHV3.

Cet effet des récepteurs héparanes sulfates sur la production d'IL-12 est plutôt inattendu, car les protéines transmembranaires (syndécans) ne sont pas directement impliquées dans l'activation des cytokines, mais nécessitent une activation d'un TLR (Compton *et al.*, 2003). Le cytomégalovirus peut utiliser le TLR4 en association avec le CD14 (Compton *et al.*, 2003). Il est possible de supposer que l'effet des virus sur la production d'IL-12 passerait plutôt par les régions héparanes sulfates et le TLR4 que par le TLR2. Par contre, les inhibitions des cytokines ont été plus faibles chez les cellules myéloïdes de souris *Ceacam-1a-/-* et, qui plus est, l'IL-12 a été même augmentée en présence d'héparine et du MHV-A59. Des effets similaires ont été observés avec l'inhibiteur du TLR2. Il est possible que l'absence de l'effet inhibiteur de la molécule CEACAM-1 chez ces cellules permette de mieux voir les effets des

virus sur les régions héparanes sulfates et des TLR. Afin de clarifier le rôle de ces récepteurs en fonction des différents virus, des études subséquentes seront nécessaires.

5.2.3- Effets de l'infection des macrophages sur leur fonctions immunomodulatrices

Comme l'infection des macrophages myéloïdes par les virus L2-MHV3, C43-MHV3 et MHV-A59 a entraîné une diminution de la production de certaines cytokines par ces cellules, la capacité des macrophages à supporter les fonctions immunitaires des lymphocytes pourrait alors être altérée. Dans les cultures cellulaires de souris C57BL/6, la capacité métabolique des lymphocytes spléniques a été fortement augmentée par le contact direct avec des macrophages infectés par les trois virus étudiés, alors qu'elle a été faiblement inhibée lorsque les lymphocytes n'étaient en contact qu'avec les substances solubles produites par les macrophages (Fig. 38). Cette inhibition pourrait avoir été causée par la baisse de production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages infectés. En effet, le TNF- α stimule la production de plusieurs autres cytokines inflammatoires par les macrophages, dont l'IL-6, à laquelle répondent les lymphocytes T et B activés (Cavaillon, 1993; Matsumura et Kobayashi, 2004). De plus, l'IL-10 et l'IL-12 sont impliquées dans la prolifération et l'activation des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules NK, et l'IL-10 induit également la prolifération des lymphocytes B (Brunda, 1994; Hacham *et al.*, 2004). L'infection des macrophages de souris SJL avait entraîné une diminution moindre de la production de cytokines, et la capacité métabolique des lymphocytes en contact seulement avec les substances solubles produites par les macrophages infectés a été supérieure. Cette plus faible inhibition de cytokines pourrait favoriser une réponse anti-virale plus efficace chez cette souris. Effectivement, l'infection virale avec le MHV3 entraîne une immunodéficiences des cellules T et B moins importante chez les souris semi-résistantes (Lamontagne *et al.*, 1989). Malgré les différences observées dans la capacité métabolique des lymphocytes, le pourcentage d'apoptose de ces cellules n'a pas été significativement affecté par le contact direct ou indirect avec les macrophages infectés (Fig. 39).

Nous avons tout de même observé qu'en présence ou en absence de virus, la capacité métabolique des lymphocytes est supérieure et leur pourcentage d'apoptose est inférieur lorsque ces cellules sont en contact direct, plutôt qu'indirect, avec les macrophages myéloïdes. Le contact entre les lymphocytes et les macrophages peut favoriser la survie des lymphocytes. En effet, l'induction d'un signal activateur chez les lymphocytes T via leur TCR lors du processus de présentation d'antigènes par les macrophages, le contact entre la molécule B7 à la surface des macrophages avec le CD28 exprimé par les lymphocytes, et/ou l'interaction entre le CD40 de la surface des macrophages avec son ligand chez les lymphocytes sont impliqués dans l'activation, la prolifération et la survie des lymphocytes (Harris et Ronchese, 1999; Becher *et al.*, 2000).

La stimulation du métabolisme des lymphocytes de souris C57BL/6 en contact direct avec les macrophages infectés pourrait être reliée à la fixation des cellules sur les macrophages infectés, et cette hypothèse a été vérifiée en microscopie confocale (Fig. 40). Nous avons observés dans les co-cultures de macrophages myéloïdes et de lymphocytes spléniques de souris C57BL/6 infectés par les virus L2-MHV3 et C43-MHV3 la présence de syncytia exprimant des protéines virales. Les virus MHV3 sont connus pour induire la formation de syncytia dans les cultures de macrophages chez les souris susceptibles (*Ceacam-1a*^{+/+}) (Lamontagne et Dupuy, 1985). Des lymphocytes B, dont certains exprimaient des protéines virales, étaient associés aux syncytia. Ces cellules pourraient être activées par ce contact ou encore fusionner avec les autres cellules et mourir par apoptose ou nécrose puisque la glycoprotéine S exprimée à la surface des cellules infectées peut contribuer à la fusion avec les cellules environnantes non-infectées par fixation entre la glycoprotéine S et le récepteur cellulaire CEACAM-1a (Bergmann *et al.*, 2006). La permissivité des lymphocytes B aux virus MHV3 a été mise en évidence par Jolicoeur et Lamontagne (1990).

Le rôle de la réplication virale dans cette apoptose est renforcé par le fait que dans les cultures cellulaires de souris SJL, aucun syncytia et aucune cellule exprimant des protéines virales n'a été détectée, alors qu'une faible quantité de protéines virales a été observée dans les cultures cellulaires de souris *Ceacam-1a*^{-/-}, suggérant que les virus pourraient se fixer et/ou infecter ces cellules malgré l'absence du récepteur viral.

5.3- La maladie neurologique induite par le MHV3

Les événements observés dans le SNC sont le résultat de l'action combinée des cellules résidentes et recrutées. Nos modèles *in vitro* ont permis de disséquer certaines des composantes immunitaires à la base de la réponse observée.

Ainsi, la permissivité des cellules endothéliales cérébrales de souris C57BL/6 aux virus L2-MHV3 et C43-MHV3 pourrait favoriser l'entrée dans le SNC des virus en provenance du sang. Les virus L2-MHV3 et C43-MHV3 pourraient également infecter les cellules endothéliales de souris *Ceacam-1a-/- in vivo*, par un mécanisme indépendant de la présence du récepteur viral et qui pourrait dépendre du récepteur TLR2, des régions riches en héparanes sulfates, ou d'autres récepteurs alternatifs qui demeurent à identifier. L'infection des cellules endothéliales de souris *Ceacam-1a-/-* par les virus MHV3 pourrait entraîner l'entrée du virus dans le SNC et induire une maladie neurologique, ce qui reste à démontrer *in vivo*.

L'infection des cellules endothéliales cérébrales altère la barrière hémato-encéphalique, et même des variants viraux n'infectant pas (ou très peu à des niveaux indétectables) les cellules endothéliales, pourraient aussi altérer les fonctions de ces cellules via leur fixation à des récepteurs héparanes sulfates, TLR2 ou autres. Ces altérations incluent notamment l'inhibition de la production de PGE₂, qui pourrait augmenter l'inflammation et causer des problèmes vasculaires, particulièrement en favorisant la coagulation intravasculaire (Chung *et al.*, 1991).

Les cellules inflammatoires sanguines provenant de la moelle osseuse ou les cellules de la microglie pourraient être impliquées dans l'apport de TNF- α à la barrière hémato-encéphalique, et nous avons démontré que le TNF- α peut augmenter la production de cytokines par les cellules endothéliales. Par contre, les infections virales des macrophages myéloïdes, et potentiellement des cellules de la microglie, ce qui reste à démontrer, diminuent la production de cytokines inflammatoires, dont le TNF- α . Cette inhibition pourrait contribuer à diminuer l'intensité de la réaction inflammatoire *in vivo*, mais aussi à réduire l'immunité innée anti-virale. Dans un contexte d'infection chronique avec le virus MHV3, un déficit en cellules NK pourrait également contribuer à réduire l'immunité innée anti-virale, puisqu'il a été démontré que la population de

cellules NK spléniques et myéloïdes était diminuée chez les souris infectées par le L2-MHV3 (Lehoux *et al.*, 2004). Une immunodéficience en lymphocytes B se produit également chez les souris semi-susceptibles infectées par le virus L2-MHV3 jusqu'au 15^e jour p.i., mais cette diminution se résorbe graduellement durant l'infection chronique (Jolicoeur et Lamontagne, 1995).

Les lymphocytes B et les cellules NK étant permissifs à l'infection virale par le MHV3, ces cellules pourraient être infectées suite au contact avec des cellules de la microglie ou des cellules endothéliales infectées, participant à l'immunodéficience généralisée induite par le MHV3 qui diminue l'apport de cellules immunitaires au cerveau, empêchant le processus d'élimination virale. Aussi, le variant C43-MHV3 a montré des propriétés semblables au virus L2-MHV3, quoique légèrement plus faibles au niveau de sa réplication dans les cellules endothéliales et dans la diminution de la production d'IL-6 et de PGE₂, ce qui suggère que ce virus a relativement maintenu ses propriétés même après 105 jours de persistance virale dans le cerveau (Lamontagne *et al.*, 1990). Cette hypothèse est aussi supportée par les fortes ressemblances avec le virus L2-MHV3 dans la diminution des cytokines macrophagiques qu'il a induit.

La faiblesse de la réponse immunitaire ainsi que la capacité des cellules endothéliales cérébrales à supporter une infection virale persistante pourraient donc être de nouveaux facteurs favorisant le développement de la maladie neurologique chronique.

5.4- Conclusion et développements futurs

Au cours de ce travail, nous avons identifié certaines anomalies fonctionnelles au niveau de la nature des cytokines induites en présence de différents sérotypes neurotropes du virus MHV chez des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux et des macrophages myéloïdes de différentes lignées de souris exprimant ou non le gène *Ceacam-1a*. Nous avons montré que les récepteurs TLR2 et les régions riches en héparanes sulfates pouvaient être impliqués dans certains des effets observés, mais pas tous.

Il reste à démontrer que les anomalies fonctionnelles des macrophages myéloïdes infectés sont également observées chez les cellules de la microglie cultivées

in vitro. De plus, il reste à expliquer l'influence du virus MHV-A59, dont la réplication est demeurée indétectable par la méthode des dilutions limites, sur la production de cytokines comme l'IFN- α ou l'IL-6 par les cellules endothéliales cérébrales. La RT-PCR des lysats cellulaires, étant une technique plus sensible, pourrait permettre de mieux comprendre les résultats obtenus. Aussi, les voies par lesquelles les virus modulent la production de cytokines par les cellules endothéliales cérébrales et les macrophages myéloïdes, autres que via les récepteurs CEACAM-1, TLR2 et héparanes sulfates, demeurent à être identifiées.

Les résultats et les observations originales de ce travail serviront de premiers jalons à des études ultérieures sur les mécanismes cellulaires et les voies de signalisation impliquées. Aussi, l'importance de la permissivité des cellules endothéliales cérébrales à des infections virales persistantes avec des désordres fonctionnels de la réponse inflammatoire, tel qu'observé avec les virus MHV3, mais non pas avec le virus MHV-A59, ouvre une nouvelle avenue de recherche dans la compréhension des bris de tolérance de la barrière hémato-encéphalique.

6- RÉFÉRENCES

- Abbott, N. J., Ronnback, L. et Hansson, E. 2006. *Nat Rev Neurosci* 7: 41-53.
- Aderka, D., Engelmann, H., Maor, Y., Brakebusch, C. et Wallach, D. 1992. *J Exp Med* 175: 323-9.
- Aloisi, F., De Simone, R., Columba-Cabezas, S. et Levi, G. 1999. *J Neurosci Res* 56: 571-80.
- Andres, O., Obojes, K., Kim, K. S., ter Meulen, V. et Schneider-Schaulies, J. 2003. *J Gen Virol* 84: 1189-97.
- Banerjee, S., Narayanan, K., Mizutani, T. et Makino, S. 2002. *J Virol* 76: 5937-48.
- Banks, W. A., Robinson, S. M., Wolf, K. M., Bess, J. W., Jr. et Arthur, L. O. 2004. *Neuroscience* 128: 143-53.
- Barth, H., Schafer, C., Adah, M. I., Zhang, F., Linhardt, R. J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., Van Kuppevelt, T. H., Depla, E., Von Weizsacker, F., Blum, H. E. et Baumert, T. F. 2003. *J Biol Chem* 278: 41003-12.
- Bazzoni, F. et Beutler, B. 1996. *N Engl J Med* 334: 1717-25.
- Becher, B., Prat, A. et Antel, J. P. 2000. *Glia* 29: 293-304.
- Benveniste, E. N. et Benos, D. J. 1995. *Faseb J* 9: 1577-84.
- Bergmann, C. C., Altman, J. D., Hinton, D. et Stohlman, S. A. 1999. *J Immunol* 163: 3379-87.
- Bergmann, C. C., Lane, T. E. et Stohlman, S. A. 2006. *Nat Rev Microbiol* 4: 121-32.
- Bermopohl, D., Halle, A., Freyer, D., Dagand, E., Braun, J. S., Bechmann, I., Schroder, N. W. et Weber, J. R. 2005. *J Clin Invest* 115: 1607-15.
- Bieback, K., Lien, E., Klagge, I. M., Avota, E., Schneider-Schaulies, J., Duprex, W. P., Wagner, H., Kirschning, C. J., Ter Meulen, V. et Schneider-Schaulies, S. 2002. *J Virol* 76: 8729-36.
- Billiau, A. et Dijkmans, R. 1990. *Biochem Pharmacol* 40: 1433-9.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. et Howard, J. C. 1997. *Annu Rev Immunol* 15: 749-95.
- Boulton, I. C. et Gray-Owen, S. D. 2002. *Nat Immunol* 3: 229-36.
- Brankin, B., Hart, M. N., Cosby, S. L., Fabry, Z. et Allen, I. V. 1995. *J Neuroimmunol* 56: 1-8.
- Brian, D. A. et Baric, R. S. 2005. *Curr Top Microbiol Immunol* 287: 1-30.
- Bruna, M. J. 1994. *J Leukoc Biol* 55: 280-8.
- Butt, A. M. 2006. *Glia* 54: 666-75.
- Cannella, B. et Raine, C. S. 2004. *Ann Neurol* 55: 46-57.
- Cao, C., Matsumura, K., Yamagata, K. et Watanabe, Y. 1998. *Brain Res Mol Brain Res* 56: 45-56.
- Carsillo, T., Traylor, Z., Choi, C., Niewiesk, S. et Oglesbee, M. 2006. *J Virol* 80: 11031-9.
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. et Williamson, B. 1975. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 3666-70.
- Cavaillon, J. M. 1993. *Pathol Biol (Paris)* 41: 799-811.
- Chang, S., Dolganiuc, A. et Szabo, G. 2007. *J Leukoc Biol* 82: 479-87.
- Chehimi, J. et Trinchieri, G. 1994. *J Clin Immunol* 14: 149-61.
- Chen, L., Yang, P. et Kijlstra, A. 2002. *Ocul Immunol Inflamm* 10: 27-39.

- Chung, S. W., Sinclair, S. B., Fung, L. S., Cole, E. H. et Levy, G. A. 1991. *Prostaglandins* 42: 501-13.
- Coccia, E. M., Uze, G. et Pellegrini, S. 2006. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 52: 77-87.
- Compton, T., Kurt-Jones, E. A., Boehme, K. W., Belko, J., Latz, E., Golenbock, D. T. et Finberg, R. W. 2003. *J Virol* 77: 4588-96.
- Cooper, A., Tal, G., Lider, O. et Shaul, Y. 2005. *J Immunol* 175: 3165-76.
- Couraud, P. O. 1994. *J Leukoc Biol* 56: 407-15.
- Coutelier, J. P., Godfraind, C., Dveksler, G. S., Wysocka, M., Cardellicchio, C. B., Noel, H. et Holmes, K. V. 1994. *Eur J Immunol* 24: 1383-90.
- Cray, C., Mateo, M. O. et Altman, N. H. 1993. *Lab Anim Sci* 43: 169-74.
- Danese, S., Dejana, E. et Fiocchi, C. 2007. *J Immunol* 178: 6017-22.
- de Boer, A. G. et Gaillard, P. J. 2006. *J Neural Transm* 113: 455-62.
- de Haan, C. A., Li, Z., te Lintelo, E., Bosch, B. J., Haijema, B. J. et Rottier, P. J. 2005. *J Virol* 79: 14451-6.
- de Haan, C. A., Te Lintelo, E., Li, Z., Raaben, M., Wurdinger, T., Bosch, B. J. et Rottier, P. J. 2006. *J Virol* 80: 10909-18.
- Delhaye, S., Paul, S., Blakqori, G., Minet, M., Weber, F., Staeheli, P. et Michiels, T. 2006. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 7835-40.
- Diehl, S. et Rincon, M. 2002. *Mol Immunol* 39: 531-6.
- Djukic, M., Mildner, A., Schmidt, H., Czesnik, D., Bruck, W., Priller, J., Nau, R. et Prinz, M. 2006. *Brain* 129: 2394-403.
- Fabry, Z., Topham, D. J., Fee, D., Herlein, J., Carlino, J. A., Hart, M. N. et Sriram, S. 1995. *J Immunol* 155: 325-32.
- Fee, D., Grzybicki, D., Dobbs, M., Ihyer, S., Clotfelter, J., Macvilay, S., Hart, M. N., Sandor, M. et Fabry, Z. 2000. *Cytokine* 12: 655-65.
- Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M. et O'Garra, A. 1991. *J Immunol* 147: 3815-22.
- Fleury, H. J., Sheppard, R. D., Bornstein, M. B. et Raine, C. S. 1980. *Neuropathol Appl Neurobiol* 6: 165-79.
- Flugel, A., Bradl, M., Kreutzberg, G. W. et Graeber, M. B. 2001. *J Neurosci Res* 66: 74-82.
- Francis, K., Van Beek, J., Canova, C., Neal, J. W. et Gasque, P. 2003. *Expert Rev Mol Med* 2003: 1-19.
- Frigerio, S., Silei, V., Ciusani, E., Massa, G., Lauro, G. M. et Salmaggi, A. 2000. *J Neuroimmunol* 105: 109-14.
- Garden, G. A. et Moller, T. 2006. *J Neuroimmune Pharmacol* 1: 127-37.
- Garlanda, C. et Dejana, E. 1997. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1193-202.
- Gaudreault, E., Fiola, S., Olivier, M. et Gosselin, J. 2007. *J Virol* 81: 8016-24.
- Gehrmann, J., Matsumoto, Y. et Kreutzberg, G. W. 1995. *Brain Res Brain Res Rev* 20: 269-87.
- Godfraind, C. et Coutelier, J. P. 1998. *Histol Histopathol* 13: 181-99.
- Godfraind, C., Havaux, N., Holmes, K. V. et Coutelier, J. P. 1997. *J Neurovirol* 3: 428-34.
- Godfraind, C., Holmes, K. V. et Coutelier, J. P. 1998. *Adv Exp Med Biol* 440: 569-74.
- Godfraind, C., Langreth, S. G., Cardellicchio, C. B., Knobler, R., Coutelier, J. P., Dubois-Dalcq, M. et Holmes, K. V. 1995. *Lab Invest* 73: 615-27.
- Gu, J. et Korteweg, C. 2007. *Am J Pathol* 170: 1136-47.

- Guenet, J. L. 2005. *Brief Funct Genomic Proteomic* 4: 225-40.
- Guo, J. Y., Huo, H. R., Zhao, B. S., Liu, H. B., Li, L. F., Guo, S. Y. et Jiang, T. L. 2006. *Am J Chin Med* 34: 685-93.
- Hacham, M., White, R. M., Argov, S., Segal, S. et Apte, R. N. 2004. *Eur Cytokine Netw* 15: 37-46.
- Hamm, S., Dehouck, B., Kraus, J., Wolburg-Buchholz, K., Wolburg, H., Risau, W., Cecchelli, R., Engelhardt, B. et Dehouck, M. P. 2004. *Cell Tissue Res* 315: 157-66.
- Haring, J. et Perlman, S. 2001. *Curr Opin Microbiol* 4: 462-6.
- Harris, N. L. et Ronchese, F. 1999. *Immunol Cell Biol* 77: 304-11.
- Hemmila, E., Turbide, C., Olson, M., Jothy, S., Holmes, K. V. et Beauchemin, N. 2004. *J Virol* 78: 10156-65.
- Hengel, H., Koszinowski, U. H. et Conzelmann, K. K. 2005. *Trends Immunol* 26: 396-401.
- Herbst-Kralovetz, M. et Pyles, R. 2006. *Herpes* 13: 37-41.
- Herrmann, I., Kellert, M., Schmidt, H., Mildner, A., Hanisch, U. K., Bruck, W., Prinz, M. et Nau, R. 2006. *Infect Immun* 74: 4841-8.
- Hickey, W. F. 2001. *Glia* 36: 118-24.
- Holmes, K. V. (1986). Replication of Coronaviruses. *Fundamental Virology*. B. N. F. e. al. New York, Raven Press: pp. 513-525.
- Holmes, K. V. et Lai, M. M. C. (1996). Coronaviridae: The Viruses and Their Replication. *Virology*. B. N. F. e. al. New York, Lippincott-Raven. **Volume 1**: pp. 1075-1093.
- Houtman, J. J. et Fleming, J. O. 1996. *J Neurovirol* 2: 101-10.
- Hull, M., Muksch, B., Akundi, R. S., Waschbisch, A., Hoozemans, J. J., Veerhuis, R. et Fiebich, B. L. 2006. *Neurochem Int* 48: 663-72.
- Iacono, K. T., Kazi, L. et Weiss, S. R. 2006. *J Virol* 80: 6834-43.
- Jack, C. S., Arbour, N., Manusow, J., Montgrain, V., Blain, M., McCrea, E., Shapiro, A. et Antel, J. P. 2005. *J Immunol* 175: 4320-30.
- Jacomy, H. et Talbot, P. J. 2003. *Virology* 315: 20-33.
- Jacques, A., Bleau, C., Martin, J. P. et Lamontagne, L. 2008. *Clin Exp Immunol*.
- Jacques, A., Bleau, C., Turbide, C., Beauchemin, N. et Lamontagne, L. article en révision.
- Jolicoeur, P. et Lamontagne, L. 1990. *Adv Exp Med Biol* 276: 543-52.
- Jolicoeur, P. et Lamontagne, L. 1995. *Adv Exp Med Biol* 380: 193-5.
- Jones, E. Y., Stuart, D. I. et Walker, N. P. 1989. *Nature* 338: 225-8.
- Joseph, J., Grun, J. L., Lublin, F. D. et Knobler, R. L. 1993. *J Neuroimmunol* 42: 47-52.
- Kammerer, R., Stober, D., Singer, B. B., Obrink, B. et Reimann, J. 2001. *J Immunol* 166: 6537-44.
- Kang, H., Yang, P. Y. et Rui, Y. C. 2008. *Eur J Pharmacol* 580: 175-81.
- Kawanokuchi, J., Mizuno, T., Takeuchi, H., Kato, H., Wang, J., Mitsuma, N. et Suzumura, A. 2006. *Mult Scler* 12: 558-64.
- Konat, G. W., Kielian, T. et Marriott, I. 2006. *J Neurochem* 99: 1-12.
- Konsman, J. P., Drukarch, B. et Van Dam, A. M. 2007. *Clin Sci (Lond)* 112: 1-25.
- Korn, T., Rao, M. et Magnus, T. 2007. *Neuromolecular Med* 9: 1-16.

- Krady, J. K., Lin, H. W., Liberto, C. M., Basu, A., Kremlev, S. G. et Levison, S. W. 2008. *J Neurosci Res*.
- Kramer-Hammerle, S., Rothenaigner, I., Wolff, H., Bell, J. E. et Brack-Werner, R. 2005. *Virus Res* 111: 194-213.
- Krzystyniak, K. et Dupuy, J. M. 1983. *Biomed Pharmacother* 37: 68-74.
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1315-20.
- Ladeby, R., Wirenfeltd, M., Garcia-Ovejero, D., Fenger, C., Dissing-Olesen, L., Dalmau, I. et Finsen, B. 2005. *Brain Res Brain Res Rev* 48: 196-206.
- Lamontagne, L., Decarie, D. et Jolicoeur, P. 1990. *Viral Immunol* 3: 1-8.
- Lamontagne, L., Descoteaux, J. P. et Jolicoeur, P. 1989. *J Immunol* 142: 4458-65.
- Lamontagne, L. et Dupuy, J. M. 1984a. *Adv Exp Med Biol* 173: 315-26.
- Lamontagne, L. et Dupuy, J. M. 1985. *Genetic Control of Host Resistance to Infection and Malignancy*: 141-150.
- Lamontagne, L. et Jolicoeur, P. 1991. *J Immunol* 146: 3152-9.
- Lamontagne, L., Jolicoeur, P., Decarie, D. et Menezes, J. 1996. *Immunology* 88: 220-9.
- Lamontagne, L. M. et Dupuy, J. M. 1984b. *Infect Immun* 44: 716-23.
- Lampert, P. W., Sims, J. K. et Kniazeff, A. J. 1973. *Acta Neuropathol (Berl)* 24: 76-85.
- Lardans, V., Godfraind, C., van der Logt, J. T., Heessen, W. A., Gonzalez, M. D. et Coutelier, J. P. 1996. *J Gen Virol* 77 (Pt 5): 1005-9.
- Lavi, E., Gilden, D. H., Highkin, M. K. et Weiss, S. R. 1984. *J Virol* 51: 563-6.
- Lee, J. H., Lee, J., Seo, G. H., Kim, C. H. et Ahn, Y. S. 2007. *J Mol Neurosci* 32: 145-54.
- Lee, Y. B., Nagai, A. et Kim, S. U. 2002. *J Neurosci Res* 69: 94-103.
- Lehoux, M., Jacques, A., Lusignan, S. et Lamontagne, L. 2004. *Clin Exp Immunol* 137: 41-51.
- Levi, G., Minghetti, L. et Aloisi, F. 1998. *Biochimie* 80: 899-904.
- Levings, M. K., Bacchetta, R., Schulz, U. et Roncarolo, M. G. 2002. *Int Arch Allergy Immunol* 129: 263-76.
- Levy-Leblond, E. et Dupuy, J. M. 1977. *J Immunol* 118: 1219-22.
- Li, Y., Fu, L., Gonzales, D. M. et Lavi, E. 2004. *J Virol* 78: 3398-406.
- Lin, M. T., Stohlman, S. A. et Hinton, D. R. 1997. *J Virol* 71: 383-91.
- Liu, Y. et Zhang, X. 2005. *J Virol* 79: 47-56.
- Lucas, A., Flintoff, W., Anderson, R., Percy, D., Coulter, M. et Dales, S. 1977. *Cell* 12: 553-60.
- Madu, I. G., Chu, V. C., Lee, H., Regan, A. D., Bauman, B. E. et Whittaker, G. R. 2007. *Avian Dis* 51: 45-51.
- Markel, G., Gruda, R., Achdout, H., Katz, G., Nechama, M., Blumberg, R. S., Kammerer, R., Zimmermann, W. et Mandelboim, O. 2004. *J Immunol* 173: 3732-9.
- Matsuguchi, T., Takagi, K., Musikacharoen, T. et Yoshikai, Y. 2000. *Blood* 95: 1378-85.
- Matsumura, K. et Kobayashi, S. 2004. *Front Biosci* 9: 2819-26.
- Matthews, A. E., Weiss, S. R. et Paterson, Y. 2002. *J Neurovirol* 8: 76-85.
- Matthews, A. E., Weiss, S. R., Shlomchik, M. J., Hannum, L. G., Gombold, J. L. et Paterson, Y. 2001. *J Immunol* 167: 5254-63.

- Mattsson, G., Carlsson, P. O., Olausson, K. et Jansson, L. 2002. *Pancreatology* 2: 155-62.
- Meja, K. K., Barnes, P. J. et Giembycz, M. A. 1997. *Br J Pharmacol* 122: 149-57.
- Meng, G., Grabiec, A., Rutz, M., Metzger, J., Lupp, P. B., Wagner, H., Bauer, S. et Kirschning, C. J. 2005. *Immunol Lett* 98: 200-7.
- Minagar, A., Shapshak, P., Fujimura, R., Ownby, R., Heyes, M. et Eisdorfer, C. 2002. *J Neurol Sci* 202: 13-23.
- Minghetti, L., Polazzi, E., Nicolini, A. et Levi, G. 1998. *J Neuroimmunol* 82: 31-9.
- Miura, T. A., Travanty, E. A., Oko, L., Bielefeldt-Ohmann, H., Weiss, S. R., Beauchemin, N. et Holmes, K. V. 2008. *J Virol* 82: 755-63.
- Mogensen, T. H. et Paludan, S. R. 2005. *J Mol Med* 83: 180-92.
- Muller, M. M., Singer, B. B., Klaile, E., Obrink, B. et Lucka, L. 2005. *Blood* 105: 3925-34.
- Munoz-Fernandez, M. A. et Fresno, M. 1998. *Prog Neurobiol* 56: 307-40.
- Munzenmaier, D. H. et Harder, D. R. 2000. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H1163-7.
- Nagaishi, T., Iijima, H., Nakajima, A., Chen, D. et Blumberg, R. S. 2006. *Ann N Y Acad Sci* 1072: 155-75.
- Nakagaki, K., Nakagaki, K. et Taguchi, F. 2005. *J Virol* 79: 6102-10.
- Nataf, S., Stahel, P. F., Davoust, N. et Barnum, S. R. 1999. *Trends Neurosci* 22: 397-402.
- Neher, J. J. et Brown, G. C. 2007. *Biochem Soc Trans* 35: 1166-7.
- Nikcevich, K. M., Gordon, K. B., Tan, L., Hurst, S. D., Kroepfl, J. F., Gardinier, M., Barrett, T. A. et Miller, S. D. 1997. *J Immunol* 158: 614-21.
- Ontiveros, E., Kim, T. S., Gallagher, T. M. et Perlman, S. 2003. *J Virol* 77: 10260-9.
- Penkowa, M., Camats, J., Hadberg, H., Quintana, A., Rojas, S., Giralt, M., Molinero, A., Campbell, I. L. et Hidalgo, J. 2003. *J Neurosci Res* 73: 481-96.
- Perlman, S. et Dandekar, A. A. 2005. *Nat Rev Immunol* 5: 917-27.
- Perry, V. H., Bell, M. D., Brown, H. C. et Matyszak, M. K. 1995. *Curr Opin Neurobiol* 5: 636-41.
- Ponomarev, E. D., Novikova, M., Maresz, K., Shriver, L. P. et Dittel, B. N. 2005. *J Immunol Methods* 300: 32-46.
- Popko, B. et Baerwald, K. D. 1999. *Neurochem Res* 24: 331-8.
- Prevost, C. L., Virelizier, J. L. et Dupuy, J. M. 1975. *J Immunol* 115: 640-3.
- Pyrk, K., Berkhout, B. et van der Hoek, L. 2007. *Expert Rev Anti Infect Ther* 5: 245-53.
- Quan, N. et Banks, W. A. 2007. *Brain Behav Immun* 21: 727-35.
- Raivich, G. et Banati, R. 2004. *Brain Res Brain Res Rev* 46: 261-81.
- Remoli, M. E., Giacomini, E., Lutfalla, G., Dondi, E., Orefici, G., Battistini, A., Uze, G., Pellegrini, S. et Coccia, E. M. 2002. *J Immunol* 169: 366-74.
- Rempel, J. D., Murray, S. J., Meisner, J. et Buchmeier, M. J. 2004. *Virology* 318: 381-92.
- Rempel, J. D., Quina, L. A., Blakely-Gonzales, P. K., Buchmeier, M. J. et Gruol, D. L. 2005. *J Virol* 79: 4369-81.
- Risau, W., Esser, S. et Engelhardt, B. 1998. *Pathol Biol (Paris)* 46: 171-5.
- Rummel, C., Sachot, C., Poole, S. et Luheshi, G. N. 2006. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R1316-26.
- Ruoslahti, E. 1989. *J Biol Chem* 264: 13369-72.

- Saif, L. J. 1993. *Vet Microbiol* 37: 285-97.
- Salgado, A., Boveda, J. L., Monasterio, J., Segura, R. M., Mourelle, M., Gomez-Jimenez, J. et Peracaula, R. 1994. *Haemostasis* 24: 132-8.
- Schickli, J. H., Zelus, B. D., Wentworth, D. E., Sawicki, S. G. et Holmes, K. V. 1997. *J Virol* 71: 9499-507.
- Schindler, L., Klimetzek, V. et Kirchner, H. 1983. *Immunol Lett* 7: 107-10.
- Schulze, A., Gripon, P. et Urban, S. 2007. *Hepatology* 46: 1759-68.
- Sehgal, P. B. 1990. *J Invest Dermatol* 94: 2S-6S.
- Singer, B. B., Scheffrahn, I., Heymann, R., Sigmundsson, K., Kammerer, R. et Obrink, B. 2002. *J Immunol* 168: 5139-46.
- Skoldenberg, B. 1996. *Scand J Infect Dis Suppl* 100: 8-13.
- Stohlman, S. A., Bergmann, C. C., Cua, D. J., Lin, M. T., Ho, S., Wei, W. et Hinton, D. R. 1998. *Adv Exp Med Biol* 440: 425-30.
- Stohlman, S. A. et Weiner, L. P. 1978. *Arch Virol* 57: 53-61.
- Stoll, G. et Jander, S. 1999. *Prog Neurobiol* 58: 233-47.
- Stringer, S. E. et Gallagher, J. T. 1997. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 709-14.
- Sun, N., Grzybicki, D., Castro, R. F., Murphy, S. et Perlman, S. 1995. *Virology* 213: 482-93.
- Takaoka, A. et Yanai, H. 2006. *Cell Microbiol* 8: 907-22.
- Takeda, K. et Akira, S. 2004a. *J Dermatol Sci* 34: 73-82.
- Takeda, K. et Akira, S. 2004b. *Semin Immunol* 16: 3-9.
- Tang, S. C., Arumugam, T. V., Xu, X., Cheng, A., Mughal, M. R., Jo, D. G., Lathia, J. D., Siler, D. A., Chigurupati, S., Ouyang, X., Magnus, T., Camandola, S. et Mattson, M. P. 2007. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 13798-803.
- Tardieu, M., Boespflug, O. et Barbe, T. 1986. *J Virol* 60: 574-82.
- Temburni, M. K. et Jacob, M. H. 2001. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3631-2.
- Trajkovic, V., Vuckovic, O., Stosic-Grujicic, S., Miljkovic, D., Popadic, D., Markovic, M., Bumbasirevic, V., Backovic, A., Cvetkovic, I., Harhaji, L., Ramic, Z. et Mostarica Stojkovic, M. 2004. *Glia* 47: 168-79.
- Trickler, W. J., Mayhan, W. G. et Miller, D. W. 2005. *Brain Res* 1048: 24-31.
- Trinchieri, G., Wysocka, M., D'Andrea, A., Rengaraju, M., Aste-Amezaga, M., Kubin, M., Valiante, N. M. et Chehimi, J. 1992. *Prog Growth Factor Res* 4: 355-68.
- Tyler, K. L. 2004. *Rev Neurol Dis* 1: 169-78.
- van der Hoek, L. 2007. *Antivir Ther* 12: 651-8.
- van Horsen, J., Bo, L., Vos, C. M., Virtanen, I. et de Vries, H. E. 2005. *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 722-9.
- Van Wagoner, N. J. et Benveniste, E. N. 1999. *J Neuroimmunol* 100: 124-39.
- Vanden Berghe, W., Vermeulen, L., De Wilde, G., De Bosscher, K., Boone, E. et Haegeman, G. 2000. *Biochem Pharmacol* 60: 1185-95.
- Verma, S., Nakaoke, R., Dohgu, S. et Banks, W. A. 2006. *Brain Behav Immun* 20: 449-55.
- Versteeg, G. A., Slobodskaya, O. et Spaan, W. J. 2006. *J Gen Virol* 87: 1961-75.
- Virelizier, J. L. et Allison, A. C. 1976. *Arch Virol* 50: 279-85.
- Virelizier, J. L., Dayan, A. D. et Allison, A. C. 1975. *Infect Immun* 12: 1127-40.
- Vitkovic, L., Maeda, S. et Sternberg, E. 2001. *Neuroimmunomodulation* 9: 295-312.
- Wetzler, L. M. 2003. *Vaccine* 21 Suppl 2: S55-60.
- Whitley, R. J. 2006. *Antiviral Res* 71: 141-8.

- Wijburg, O. L., Heemskerk, M. H., Boog, C. J. et Van Rooijen, N. 1997. *Immunology* 92: 252-8.
- Williams, R. K., Jiang, G. S., Snyder, S. W., Frana, M. F. et Holmes, K. V. 1990. *J Virol* 64: 3817-23.
- Winnall, W. R., Ali, U., O'Bryan M, K., Hirst, J. J., Whiley, P. A., Muir, J. A. et Hedger, M. P. 2007. *Biol Reprod.*
- Wolburg, H. et Lippoldt, A. 2002. *Vascul Pharmacol* 38: 323-37.
- Wu, G. F. et Perlman, S. 1999. *J Virol* 73: 8771-80.