



Université
de Toulouse

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Neuroimmunologie*

Présentée et soutenue par Grégoire CHEVALIER
Le 16 Juin 2011

Titre :

*Analyse des interactions entre lymphocytes T CD8 et neurones au
moyen du modèle de neuroinflammation induite par le Bornavirus*

JURY

*Professeur Michel Clanet, président
Docteur Pascale Giraudon, rapporteur
Professeur Renaud Du Pasquier, rapporteur
Professeur Thomas Michiels, rapporteur*

Ecole doctorale : *Biologie-Santé-Biotechnologies*
Unité de recherche : *Inserm UMR1043*
Directeur(s) de Thèse : *Docteur Daniel Dunia et Professeur Roland Liblau*
Rapporteurs : *Dr P. Giraudon, Pr. R. Du Pasquier, Pr. T. Michiels*

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pu voir le jour sans le soutien et la contribution de nombreuses personnes que je voudrais ici remercier.

Je voudrais tout d'abord remercier les membres du jury. Je remercie le Professeur Michel Clanet qui me fait l'honneur de présider ce jury. Je tiens également à remercier le Docteur Pascale Giraudon, le Professeur Thomas Michiels et le Professeur Renaud Du Pasquier qui ont eu la lourde tâche d'être rapporteurs de ma thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de thèse, Daniel Dunia. J'ai eu la chance d'arriver dans son équipe en 2007, sans réellement savoir ce qui m'attendait. J'imagine que le questionnement était aussi présent de son côté. Sans compter qu'il s'en est fallu de peu qu'il n'ait besoin de me réapprendre à lire. Au final, j'ai beaucoup appris auprès de lui (même si je savais déjà lire) et je lui en suis énormément reconnaissant. Ses qualités humaines, son érudition dans de nombreux domaines ont été très appréciables tout au long de ses années. Merci aussi à toi pour m'avoir guidé à travers les méandres de la recherche avec pédagogie, écoute et patience, je me doute que ca n'a pas toujours dû être chose facile.

Je voudrais également remercier Roland Liblau, mon codirecteur de thèse. Si Daniel était naturellement plus présent en tant qu'encadrant principal, j'ai pu apprécier la disponibilité de Roland qui a toujours eu la porte de son bureau ouverte. Je le remercie également pour ses encouragements dans les moments de doute et de frustration. Enfin, sa curiosité scientifique et son savoir ont été et sont toujours une source d'admiration pour moi.

Je tiens également à remercier l'Association pour la Recherche contre la Sclérose en Plaques ou ARSEP, qui a financé ma thèse pendant 3 ans.

Un grand merci aussi aux membres de la Dunia team (ou Borna team, mais il faut savoir flatter l'égo de son chef), présents ou partis. Merci à Elsa, Carine, Christine et Aline pour tous les bons moments passés, le rhum quand il est tard au labo, la musique partagée...

Merci aussi aux membre actuels de l'équipe : Cécile, Marion, Caroline, Charlotte et Alex. L'équipe s'est étoffée ces derniers temps avec bonne humeur, entre restaurants d'équipe et gâteaux au chocolat... Une pensée particulière pour Alex et les soirées breakdance & booty shaking.

Je me suis beaucoup amusé et c'est également grâce à tous les membres de la grande équipe RL/AS/DGD ou l'ex-équipe "Autoimmunité et immunorégulation", que ce soit à Toulouse, Marseille, Paris, Berlin ou Barcelone. En particulier, je remercie Abdelhadi Saoudi pour ses conseils, sa bonne humeur et son pas de merengue que je n'arriverai jamais à reproduire. Les membres de l'équipe de Roland : Lennart, Amit, Liliana, Béa, Guillaume et Raouf. Une pensée là aussi pour Guillaume qui aura sûrement du pain sur la planche par ma faute. Je n'oublie pas les filles du labo : Sabine, Lise, Nadège, Flo et Cécile qui généralement me voyaient arriver quand j'avais besoin de me changer les idées ou de trouver quelqu'un à embêter. Les membres de l'équipe d'Abdel et de la future équipe d'Anne: Isa, Cécé, Audrey, Christophe (qui a un gros potentiel, inexploité au labo, demander à Polly), Marianne et Anne bien sûr, qui m'a appris l'italien.

L'institut ne s'arrête pas aux portes de l'étage, alors merci aussi à tous ceux qui m'ont soutenu (supporté) pendant ces années à travers le CPTP: Nico B., Nathalie dite "La Joncker", Nico F. qui renvoie bien la balle pour un sparring partner, Jeremy dit "Le Kagan", Antoine dit "Le Sacquin", Gilles, Emilie, Nico G. et Svet qui sont convaincus qu'ils peuvent finir en roue libre puisque "regarde, si Greg arrive à soutenir, on est large !", Cyril et tous les autres. Un grand merci aussi aux membres passés de cet institut : Laure, Yovan et Hicham qui m'a initié au développé-couché et que j'ai failli tuer parce que je regardais du mauvais côté de la salle.

Enfin, ma reconnaissance va à ceux et celles qui me posaient la question : “ça avance ta thèse ?” et qui s’entendaient répondre : “Lentement, toujours lentement mais sûrement” : à Estelle, mes parents, mon frère, mes sœurs et mes amis pour leur soutien.

“S’il n’y avait pas la science, malheureux cloportes suintants d’ingratitude aveugle et d’ignorance crasse, s’il n’y avait pas la Science, combien d’entre nous pourraient profiter de leur cancer pendant plus de cinq ans ?”

Pierre Desproges

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	11
SUMMARY	15
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	19
LISTE DES TABLEAUX	25
LISTE DES FIGURES	27
PREAMBULE	31
INTRODUCTION	33
1 PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL	35
1.1 HISTORIQUE DU CONCEPT DE PRIVILEGE IMMUN	35
1.2 LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE ET LA BARRIERE SANG-LCR	37
1.2.1 HISTORIQUE DU CONCEPT DE BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE	37
1.2.2 PROPRIETES DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE	39
1.2.3 PROPRIETES DE LA BARRIERE SANG-LCR	41
1.3 DRAINAGE DES ANTIGENES DU SNC A LA PERIPHERIE	43
1.4 LES CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENES DU SNC	47
1.4.1 INFILTRATION POSSIBLE DU SNC PAR LES CELLULES DENDRITIQUES	47
1.4.2 CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENES RESIDENTES DU SNC	49
1.5 REGULATION DE LA NEUROINFLAMMATION PAR DES MEDIEURS SOLUBLES	51
1.5.1 ROLE DES CYTOKINES DANS LA REGULATION DE LA NEUROINFLAMMATION	51
1.5.1.1 Rôle des cytokines anti-inflammatoires, TGF- β et IL-10	53
1.5.1.2 Rôle d'autres médiateurs solubles	53
1.5.2 ROLE DE MOLECULES SPECIFIQUES DU SNC	55
1.6 REGULATION DE LA NEUROINFLAMMATION PAR DES LIGANDS MEMBRANAIRES	57
1.6.1 ROLE DU SYSTEME FAS/FASL AU SEIN DU SNC	57
1.6.2 ROLE DES MOLECULES INHIBITRICES DE LA FAMILLE B7	59
1.6.3 ROLE DES GANGLIOSIDES	59
1.7 EXPRESSION DU COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE DE CLASSE I AU SEIN DU SNC	59
1.7.1 EXPRESSION DU CMH-I PAR LA MICROGLIE	61
1.7.2 EXPRESSION DU CMH-I PAR LES ASTROCYTES	61
1.7.3 EXPRESSION DU CMH-I PAR LES OLIGODENDROCYTES	63
1.7.4 EXPRESSION DU CMH-I PAR LES NEURONES	63

2 LA REPONSE IMMUNITAIRE ANTIVIRALE AU SEIN DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL	69
2.1 VIRUS ET SYSTEME NERVEUX CENTRAL	69
2.1.1 INFECTIONS VIRALES DU SNC CHEZ L'HOMME	69
2.1.2 INVASION DU SNC PAR LES VIRUS	71
2.1.2.1 Entrée dans l'organisme	71
2.1.2.2 Entrée dans les neurones par la périphérie	73
2.1.2.3 Recrutement de moteurs cellulaires et invasion du SNC	75
2.1.2.4 Cellules cibles au sein du SNC	77
2.1.3 MODELE ANIMAUX D'INFECTIONS VIRALES DU SNC	77
2.2 REPONSE IMMUNITAIRE INNEE ANTIVIRALE	79
2.2.1 DETECTION DES ANTIGENES VIRAUX DANS LE SNC	79
2.2.1.1 Détection virale dans le cytosol	81
2.2.1.1.1 <i>La protéine kinase dépendante de l'ARN ou PKR</i>	81
2.2.1.1.2 <i>Les hélicases à ARN cytosoliques ou RLR (RIG-Like Receptors)</i>	83
2.2.1.1.3 <i>La protéine activatrice des IRF dépendante de l'ADN ou DAI</i>	87
2.2.1.1.4 <i>Les inflammasomes</i>	87
2.2.1.2 Détection virale dans les endosomes par les TLR	93
2.2.1.3 Détection virale à la surface cellulaire	95
2.2.2 PRODUCTION D'IFN-A/B	99
2.2.2.1 Cellules productrices d'IFN- α/β	99
2.2.2.2 Réponse induite par l'IFN- α/β	99
2.2.2.3 Régulation de la réponse à l'IFN- α/β	103
2.2.2.4 Protéines virales antagonistes du système IFN de type I	103
2.3 REPONSE IMMUNITAIRE ADAPTATIVE ANTIVIRALE	105
2.3.1 INDUCTION DE LA REPONSE IMMUNE ADAPTATIVE	105
2.3.1.1 Activation des effecteurs de l'immunité adaptative	105
2.3.1.1.1 <i>Drainage des antigènes du SNC</i>	107
2.3.1.1.2 <i>Apprêtement de l'antigène et présentation croisée</i>	107
2.3.1.2 Infiltration du SNC par les lymphocytes T	111
2.3.1.2.1 <i>Infiltration par les lymphocytes T CD4</i>	113
2.3.1.2.1 <i>Infiltration par les lymphocytes T CD8</i>	113
2.3.2 ROLE CYTOLYTIQUE DES LYMPHOCYTES T CD8 DANS LE DNC	117
2.3.2.1 Engagement du lymphocyte T CD8 avec la cellule cible : formation de la synapse immunologique	117
2.3.2.2 Mode d'action des LT CD8	117
2.3.2.3 Destruction neuronale par les lymphocytes T CD8	119
2.3.2.4 Effets directs et collatéraux des lymphocytes T CD8 sur l'excitabilité neuronale	123
2.3.3 LA CLAIRANCE VIRALE, EVALUATION ET STRATEGIE	127
2.3.3.1 Clairance et contrôle de la réplication virale dans les cellules gliales	129
2.3.3.2 Clairance et contrôle de la réplication virale dans les neurones	131
2.3.3.2.1 <i>Clairance virale dépendante des lymphocytes T CD8</i>	131
2.3.3.2.2 <i>Clairance virale dépendante des anticorps</i>	133
2.3.4 CONTROLE DE LA REPLICATION VIRALE ET REGULATION DE LA REPONSE IMMUNITAIRE ADAPTATIVE	135

3 LE VIRUS DE BORNA : DESCRIPTION ET PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE	143
3.1 INTRODUCTION	143
3.2 GENOME ET PROTEINES DU BDV	145
3.2.1 ORGANISATION GENOMIQUE	145
3.2.2 LES PROTEINES DU BDV	147
3.2.2.1 La nucléoprotéine N	147
3.2.2.2 La protéine X	149
3.2.2.3 La phosphoprotéine P	149
3.2.2.4 La protéine de matrice M	151
3.2.2.5 La protéine d'enveloppe G	153
3.2.2.6 La polymérase L	153
3.3 EPIDEMIOLOGIE	153
3.3.1 METHODES DIAGNOSTIQUES	153
3.3.2 EPIDEMIOLOGIE DE L'INFECTION ANIMALE	155
3.3.2.1 Région de répartition endémique	155
3.3.2.2 Spectre d'hôte	157
3.3.2.3 Mode de transmission	159
3.3.3 EPIDEMIOLOGIE DES INFECTIONS HUMAINES	161
3.3.3.1 Mise en évidence d'infections humaines par le BDV	163
3.3.3.2 BDV et pathologies humaines	165
3.3.3.3 Le BDV, un virus endogène	167
3.4 PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION PAR LE BDV	167
3.4.1 INFECTION NATURELLE	169
3.4.1.1 Signes cliniques	169
3.4.1.2 Lésions histopathologiques	171
3.4.2 MODELES ANIMAUX EXPERIMENTAUX	171
3.4.2.1 Infection expérimentale du rat	171
3.4.2.1.1 <i>Infection du rat Lewis adulte</i>	173
3.4.2.1.2 <i>Infection néonatale du rat Lewis et troubles du comportement</i>	181
3.4.2.2 Infection expérimentale de la souris	191
3.4.2.2.1 <i>Adaptation du BDV et réceptivité des souches murines</i>	191
3.4.2.2.2 <i>La méningo-encéphalite liée à BDV dans le modèle murin</i>	193
3.4.2.2.3 <i>Mécanismes immunopathologiques</i>	195
OBJECTIFS	199
1. LES NEURONES, UNE CIBLE POUR LES LYMPHOCYTES T CD8 DANS LES PATHOLOGIES NEUROLOGIQUES ?	201
2. PROBLEMATIQUE : MIS EN EVIDENCE D'UN ROLE CYTOTOXIQUE DES LYMPHOCYTES T CD8 VIS-A-VIS DES NEURONES <i>IN VITRO</i>	203
3. MODELE D'ETUDE DE MA THESE	205
RESULTATS	209
1. ANALYSE DE L'INTERACTION ENTRE LYMPHOCYTES T CD8 ET NEURONES	211

1.1. METHODOLOGIE EXPERIMENTALE	211
1.1.1. CULTURE DE NEURONES PRIMAIRES ET INFECTION PAR LE BDV	211
1.1.2. PURIFICATION DES LYMPHOCYTES T CD8 INFILTRANT LE SNC DE RATS INFECTES PAR LE BDV	213
1.2. RESULTATS	213
1.2.1. DESCRIPTION DES CULTURES NEURONALES INFECTEES PAR LE BDV	213
1.2.1.1. Analyse de la cinétique d'infection	213
1.2.1.2. Analyse de l'expression des molécules du CMH-I par les neurones	215
1.2.2. ANALYSE PHENOTYPIQUE DES LYMPHOCYTES T CD8 INFILTRANT LE CERVEAU DE RATS INFECTES PAR LE BDV	217
1.2.2.1. Description des infiltrats inflammatoires	217
1.2.2.2. Analyse de l'expression d'effecteurs cytolytiques par RT-PCR quantitative	217
1.2.2.3. Estimation de la proportion de lymphocytes T CD8 anti-BDV parmi les lymphocytes T CD8 infiltrants	219
1.2.2.4. Analyse de l'expression de cytokines après coculture avec des neurones	221
1.2.3. ÉTUDE DE L'INTERACTION ENTRE LYMPHOCYTES T CD8 INFILTRANTS ET NEURONES	221
1.2.3.1. Analyse de la mobilité des lymphocytes T CD8 en coculture avec des neurones	223
1.2.3.2. Changement morphologique des neurones infectés induit par les lymphocytes T CD8 infiltrants	223
1.2.3.3. Changement de l'activité électrique des neurones infectés suite à l'interaction avec les lymphocytes T CD8 infiltrants	225
1.2.3.4. Induction de l'apoptose neuronale par les LT CD8 infiltrants	227
2. OBSERVATION D'UN COMPORTEMENT MEMBRANAIRE PARTICULIER DES LYMPHOCYTES T CD8 INFILTRANTS	229
DISCUSSION	233
1. LE BDV, UN OUTIL POUR UNE MEILLEURE COMPREHENSION DES MECANISMES IMMUNOPATHOLOGIQUES DANS LE SNC ?	235
1.1. LES LYMPHOCYTES T CD8 SONT-ILS LES EFFECTEURS MAJEURS D'UNE REPOSE IMMUNE DELETERE POUR LE SNC ?	235
1.1.1. DISSECTION DES MECANISMES MOLECULAIRES DE NEUROTOXICITE	235
1.1.2. LE BDV PROTEGE-T-IL DE L'APOPTOSE ?	237
1.1.3. ROLE DE L'IMMUNITE INNEE NEURONALE DANS L'EXPRESSION DU CMH-I	239
1.1.4. DEVELOPPEMENT D'APPROCHES <i>IN VIVO</i>	241
1.2. LE CARACTERE RESOLUTIF DE LA MALADIE DE BORNA: NOUVELLES VOIES D'INVESTIGATION DE LA REPOSE IMMUNE REGULATRICE DANS LE SNC ?	241
1.2.1. ÉPUISEMENT DES CTL	241
1.2.2. DELOCALISATION DU CORECEPTEUR CD8 DU COMPLEXE TCR	243
1.2.3. INDUCTION DE LYMPHOCYTES T CD8 REGULATEURS	245

2. LE “BUBBLING“ NEURONAL, SIGNE PRECOCE DE SOUFFRANCE NEURONALE LIEE A L’ATTAQUE PAR LES CTL ?	247
3. LES EXTENSIONS MEMBRANAIRES DES LYMPHOCYTES T CD8 PURIFIES DE CERVEAUX DE RATS INFECTES PAR LE BDV: UN PHENOMENE SPECIFIQUE AUX LYMPHOCYTES INFILTRANT LE SNC ?	251
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	259

RÉSUMÉ

Les lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CTL) sont aujourd'hui considérés comme des acteurs clés dans diverses pathologies neuroinflammatoires ou neurodégénératives, telles que la sclérose en plaques, l'encéphalite de Rasmussen ou la maladie d'Alzheimer. On présume qu'ils participent aux lésions neuronales observées dans ces pathologies bien que leur contribution précise reste à déterminer. En effet, la possibilité que les neurones puissent représenter une cible pour les CTL reste controversée, notamment parce que les neurones expriment peu de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) en conditions physiologiques.

Dans ce contexte, l'objectif général de ma thèse était donc d'analyser les interactions entre CTL et neurones, ainsi que leurs conséquences, au moyen d'un modèle original de neuroinflammation.

Pour cela, j'ai utilisé le modèle de neuroinflammation induite par l'infection avec le virus de Borna (BDV). L'infection intracérébrale du rat Lewis avec ce virus neurotrophe, absolument non cytolitique aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, est connue pour induire une inflammation médiée par les CTL. Les CTL purifiés à partir du cerveau de rats infectés sont incubés *ex vivo* avec des cultures primaires de neurones corticaux de rats Lewis, préalablement infectées par le BDV. Ainsi, j'ai pu analyser la dynamique et les conséquences de l'interaction entre CTL et neurones, en utilisant notamment des techniques d'imagerie en temps réel.

D'une part, j'ai pu observer que l'infection par le BDV induit l'expression de CMH-I à la surface des neurones, les rendant potentiellement susceptibles à l'attaque par les CTL. D'autre part, les CTL sont préférentiellement recrutés dans le cerveau des rats infectés et surexpriment fortement des effecteurs cytolitiques en terme d'ARNm. De plus, suite à l'incubation avec des neurones infectés, les CTL purifiés à partir du cerveau peuvent sécréter de l'IFN- γ , alors que ce n'est pas le cas

suite à une stimulation avec des neurones non infectés ou lorsque les CTL sont purifiés à partir de la périphérie.

Par la suite, l'enregistrement en temps réel des interactions CTL-neurones a révélé que la mobilité des CTL est sévèrement réduite, et ce de façon dépendante de l'interaction avec le complexe CMH-I/antigène viral, suggérant une interaction spécifique avec les neurones. En outre, l'observation de neurones marqués à la calcéine a permis de montrer des changements rapides de la morphologie neuronale, dépendant encore une fois du CMH-I.

Afin d'étudier les propriétés électrophysiologiques des neurones pendant cette attaque par les CTL, nous avons enregistré l'activité électrique de réseaux de neurones corticaux mis en culture sur des supports à électrodes multiples en collaboration avec le Pr. Le Masson (Inserm U862). De façon surprenante, l'analyse fonctionnelle des neurones montre que le réseau neuronal reste électriquement actif durant cette période. De plus, les neurones semblent assez résistants à l'attaque par les CTL puisque l'activation des caspases 3 et 7, indiquant l'induction de l'apoptose, n'est détectée qu'au bout de 4 heures de co-incubation.

Dans leur ensemble, ces données suggèrent que la dynamique de l'attaque neuronale par les CTL semble être différente de celle d'une cible conventionnelle.

SUMMARY

Cytotoxic CD8 T cells (CTLs) are increasingly recognized as key players in various inflammatory and degenerative central nervous system (CNS) disorders, such as multiple sclerosis, Rasmussen's encephalitis or Alzheimer's disease. CTLs are believed to actively contribute to neuronal damage in these CNS conditions although their relative contribution remains elusive. Indeed, the possibility that neurons could represent a target for CTLs is still controversial, in part due to the paucity of Major Histocompatibility Complex (MHC) class I expression by neurons.

Given this context, the general aim of my thesis was to analyze the dynamics of interaction between CTLs and neurons and bring new information about the mechanisms of neuronal injury caused by CTLs.

To address this question, I used the model of neuroinflammation induced by neurotropic Borna Disease Virus (BDV). Intracerebral infection of adult Lewis rat with BDV, a non-cytolytic virus, is known to induce a CD8 T cell-mediated inflammation. CTLs *ex vivo* purified from brains of BDV-infected animals were co-incubated with primary cultures of cortical neurons infected by BDV. I could then assess the dynamics and consequences of CTL interaction with neurons, using live-cell imaging and time-lapse microscopy techniques.

On one hand, I observed that BDV infection induces MHC class I expression on neurons, rendering them susceptible to CTL attack. On another hand, CTLs are preferentially recruited in the CNS of infected rats, expressing high amounts of cytolytic effector mRNA. Moreover, upon incubation with infected neurons, *ex vivo* brain-purified CTL produce IFN- γ , which is not the case when incubated with non-infected neurons or for peripheral CTLs.

Thereafter, live-cell imaging of CTL-neuron interaction revealed that CTL mobility was dramatically reduced in an MHC class I-dependent manner, suggesting specific interaction with neurons. Analysis using calcein staining showed changes in

neuronal morphology, once again dependent on MHC class I expression.

In order to investigate the effect of CTL attack on neuronal electrical properties, we recorded electrical activity of neuronal networks seeded on MicroElectrode Array (MEA), in collaboration with Pr. Le Masson (Inserm U862). Surprisingly, this analysis revealed that the neuronal network remains functionally active during this period. Moreover, neurons appeared to resist quite well to this initial CTL contact, since caspase-3 and -7 activation, indicating apoptosis induction, was detected only 4 hours after co-incubation. Taken together, these data suggest that the dynamics of CTL-neuron interaction may be quite different to that of a classical CTL target.

Taken together, these data suggest that the dynamics of CTL-neuron interaction may be quite different to that of a classical CTL target.

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNdb : ADN double brin

Ag : Antigène

AMPA : 2-Amino-3-(5-Methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl) Propanoic Acid

ARN : Acide RiboNucléique

ARNdb et ARNsb : ARN double brin et ARN simple brin

ARNm : ARN messenger

ASC : Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD

ATP : Adénosine TriPhosphate

BAFF : B-cell Activating Factor

β 2m : β 2-microglobuline

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

CAR : Coxsackievirus and Adenovirus Receptor

CARD : CAspase Recruitment Domain

CLIP : Class II-associated Invariant chain Peptide

CMH-I et -II: Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I et II

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

cSMAC : central SupraMolecular Activation Complex

CTL : Cytotoxic T Lymphocyte

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4

DAI : DNA-dependent Activator of IRFs

DAMP : Danger Associated Molecular Pattern

DC : Dendritic Cell ou cellule dendritique

dSMAC : distal SMAC

DTH : Delayed Type Hypersensitivity

EAE : Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale

EBLN : Endogenous Borna-Like N éléments

EMAP-II : Endothelial cell Monocyte-Activating Polypeptide II

GABA : Gamma-AminoButyric Acid ou acide γ -aminobutyrique

GABARAP : Gamma-AminoButyric Acid Receptor-Associated Protein
GFAP : Glial Fibrillar Acidic Protein
HVEM : HerpesVirus Entry Mediator
ICAM1 : InterCellular Adhesion Molecule 1 ou CD54
IDO : Indolamine 2,3-DiOxygenase
IFN : InterFeroN
IFNAR : IFN- α/β Receptor
MEA : MicroElectrode Array
IL : InterLeukine
IP₃ :1,3,4-Inositol-triPhosphate
IRF : IFN Regulatory Factors
ISG : IFN-Stimulated Gene
JNM : Jonction NeuroMusculaire
LacNAc : N-AcetylLactosamine
LAMP-1 : Lysosomal Associated Membrane Protein-1
LB : Lymphocyte B
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
LEMP : LeucoEncéphalopathie Multifocale Progressive
LFA1 : Leukocyte Function-associated Antigen 1
LT : Lymphocyte T
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MBP : Myelin Basic Protein
MDP : Muramyl DiPeptide
MTOC : MicroTubule Organizing Centre
nAChR : nicotinic AcetylCholin Receptor
NCAM : Neural Cell Adhesion Molecules
NF- κ B : Nuclear Factor kappa B
NK : Natural Killer
NLC : Nœuds Lymphatiques Cervicaux
OVA : Ovalbumine
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns
PCR : Polymerase Chain Reaction

PD-1 : Programmed-Death receptor-1
PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKC : Protéine Kinase C
PKR : Protein Kinase RNA-activated
PLC : PhosphoLipase C
Poly I:C : Acide PolyInosinique:PolyCytidylique
PRR : Pattern Recognition Receptors
PSGL-1 : P-Selectin Glycoprotein Ligand 1
pSMAC : peripheral SMAC
RAGE : Receptor for Advanced Glycation Endproducts
RE : Réticulum Endoplasmique
RIG-I : Retinoic acid Inducible Gene
RLR : RIG-Like Receptor
RNP : RiboNucleoProtein
RNS : Reactive Nitrogen Species
ROS : Reactive Oxygen Species
RT-PCR : Reverse Transcription PCR
SEP : Sclérose en plaques
SNC : Système Nerveux Central
SNP : Système Nerveux Périphérique
SOCS : Suppressors Of Cytokine Signaling
TAP : Transporter-associated with Antigen Presentation
TBK-1 : TANK Binding Kinase-1
TCEP : T Cell Extended Processes
TF : Tissue Factor
TGF- β : Transforming Growth Factor β
TLR : Toll-Like Receptor
TNF- α : Tumor Necrosis Factor α
TTX : TétrodoToXine
VCAM1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1

N.B. : Les sigles des virus cités dans ma thèse sont tous répertoriés dans les tableaux 2 et 3 (p 68 et 76).

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : LOCALISATION ET FONCTIONS IMMUNOLOGIQUES DES PHAGOCYTES DU SNC

60

TABLEAU 2 : VIRUS SUSCEPTIBLES D'INFECTER LE SNC CHEZ L'HOMME

68

TABLEAU 3 : VIRUS UTILISES COMME MODELE MURIN D'INFECTION DU SNC

76

TABLEAU 4 : RESUME DE LA SEROPREVALENCE ET DE LA PREVALENCE EN ARN DU BDV CHEZ

L'HOMME

164

TABLEAU 5 : SIGNES CLINIQUE DE LA MALADIE DE BORNA CHEZ LES ESPECES ANIMALES INFECTEES

NATURELLEMENT PAR LE BDV

168

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : LES DIFFERENTES BARRIERES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL	36
FIGURE 2 : STRUCTURES ANATOMIQUES IMPLIQUEES DANS LA CIRCULATION SANGUINE ET DU LCR DANS LE SNC	38
FIGURE 3 : VOIES DE PASSAGE A TRAVERS LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE	40
FIGURE 4 : MECANISMES AFFERENTS ET EFFERENTS DE SURVEILLANCE DU SNC	48
FIGURE 5 : INHIBITION DE LA MICROGLIE PAR LES NEURONES	50
FIGURE 6 : ENTREE DES VIRUS DANS LE SNC	72
FIGURE 7 : ARCHITECTURE NEURONALE ET TRANSPORT AXONALE DES VIRUS NEUROTROPES	74
FIGURE 8 : PRR CELLULAIRES	78
FIGURE 9 : DIFFERENTES VOIES DE RECONNAISSANCE VIRALE PAR LE SYSTEME IMMUNITAIRE INNE	80
FIGURE 10 : REPRESENTATION DES INFLAMMASOMES	88
FIGURE 11 : LES VOIES COUPLANT LA RECONNAISSANCE VIRALE A L'EXPRESSION DE L'IFN-α/β	98
FIGURE 12 : PROTEINES VIRALES ANTAGONISTES DE L'INDUCTION D'IFN DE TYPE 1	102
FIGURE 12BIS : PROTEINES VIRALES ANTAGONISTES DE LA SIGNALISATION PAR L'IFN DE TYPE 1	104
FIGURE 13 : MECANISMES MOLECULAIRES D'APPRETEMENT ET DE PRESENTATION DES ANTIGENES	106
FIGURE 14 : ORGANISATION ANATOMIQUE DU CERVEAU MONTRANT LES VOIES POSSIBLES D'ENTREE DES LYMPHOCYTES T ACTIVES	110
FIGURE 15 : DIFFERENTES ETAPES DE LA REPONSE T CD8 AU SNC	112
FIGURE 16 : DIFFERENTES ETAPES DE L'INFILTRATION DU SNC PAR LES LYMPHOCYTES T	114
FIGURE 17 : SEQUENCE DES EVENEMENTS DE LA LYSE D'UNE CELLULE CIBLE PAR UN CTL	116
FIGURE 18 : TROIS VOIES DIFFERENTES DE CYTOLYSE UTILISEES PAR LES CTL	118
FIGURE 19 : MECANISMES DE CLAIRANCE VIRALE DES NEURONES ET DE LA MICROGLIE	132
FIGURE 20 : L'INTERACTION PD-1/PD-L CONTRIBUE DIRECTEMENT A L'EPUISEMENT DES LT DURANT UE INFECTION VIRALE CHRONIQUE	138
FIGURE 21 : DESCRIPTION DU VIRUS DE BORNA COMME "LE VIRUS QUI REND TRISTE" AVEC "LE	

CAUCHEMAR“ DE JOHAN HEINRICH FÜSSL	142
FIGURE 22 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PROTEINES DU VIRUS DE BORNA	144
FIGURE 23 : ORGANISATION GENOMIQUE DU BDV	146

FIGURE 24 : LE VIRUS DE BORNA PEUT S'INTEGRER DANS LE GENOME HUMAIN	166
FIGURE 25 : L'INFECTION PAR LE BDV INDUIT L'EXPRESSION DE MOLECULES DU CMH-I PAR LES NEURONES	214
FIGURE 26 : CARACTERISTIQUES DES LYMPHOCYTES T CD8 PURIFIES DU CERVEAU DE RATS INFECTES PAR LE BDV	218
FIGURE 27 : LA MOBILITE DES LYMPHOCYTES T CD8 INFILTRANTS EST REDUITE SUITE AU CONTACT AVEC DES NEURONES DE FAÇON DEPENDANTE DU CMH-I ET DE L'ANTIGENE	220
FIGURE 28 : L'INTERACTION AVEC DES LYMPHOCYTES T CD8 INFILTRANTS INDUIT DES CHANGEMENTS MORPHOLOGIQUES PRECOCES DES NEURONES INFECTES PAR LE BDV	222
FIGURE 29 : L'INCUBATION AVEC LES LYMPHOCYTES T CD8 INFILTRANTS INDUIT UNE AUGMENTATION DE L'ACTIVITE ELECTRIQUE PRECOCE ET L'APOPTOSE NEURONALE	224
FIGURE 30 : RETRACTION D'UN PROLONGEMENT MEMBRANAIRE DE LT CD8 INFILTRANT	228
FIGURE 31 : PROLONGEMENT MEMBRANAIRE DE 270µM D'UN LYMPHOCYTE T CD8 INFILTRANT	230
FIGURE 32 : CONNECTION MEMBRANAIRE ENTRE DEUX LYMPHOCYTES T CD8 INFILTRANTS	230

PRÉAMBULE

Le système nerveux central (SNC) est un organe particulier de par son rôle de traitement des informations et de coordination des activités de l'organisme. Au sein de cet organe, les neurones sont les cellules qui transmettent l'information sous forme de signaux électriques et sont donc essentielles à la fonction du SNC. De ce fait, les premières observations anatomiques à la fin du XIX^e siècle décrivent une barrière entre SNC et le reste de l'organisme, appelée barrière hémato-encéphalique. Par la suite, différents travaux établirent que le SNC, et en particulier les neurones, semblent épargner par le système immunitaire adaptatif et notamment les lymphocytes T CD8 (LT CD8). Cependant, des données plus récentes ont démontré le rôle fondamental du système immunitaire et des LT CD8 dans la défense aux infections virales, y compris dans le SNC. De plus, les LT CD8 sont également considérés comme des acteurs clés dans diverses pathologies neuroinflammatoires ou neurodégénératives. Toutefois, le rôle précis des LT CD8 dans ces diverses pathologies et leur possible reconnaissance des neurones reste à établir formellement. Afin de répondre à cette question, j'ai utilisé le virus de Borna (BDV), un virus neurotrope et absolument non cytolytique, pour induire une neuroinflammation aiguë après inoculation intracérébrale chez le rat. La pathologie associée est caractérisée par une forte infiltration de LT CD8 et des lésions neuronales marquées dans certaines régions.

C'est pourquoi mon introduction bibliographique s'articulera en trois parties. Dans la première partie, je discuterai du concept de privilège immun du SNC, des premières observations princeps à son évolution jusqu'à nos jours. Je développerai ensuite dans une deuxième partie les différentes facettes de la réponse immunitaire antivirale au sein du SNC. Enfin, la troisième partie sera consacrée à la description du

virus de Borna, de son épidémiologie et de la physiopathologie des maladies associées.

INTRODUCTION

1 Propriétés immunologiques du système nerveux central

Le système nerveux central (SNC) est la partie du système nerveux comprenant l'encéphale (c'est-à-dire le cerveau, le tronc cérébral et le cervelet) et la moelle épinière. Certaines classifications incluent également la rétine et les nerfs crâniens I et II. Le SNC est protégé par la boîte crânienne pour l'encéphale et par la colonne vertébrale pour la moelle épinière. Avec le système nerveux périphérique (SNP), il a un rôle fondamental dans l'intégration des informations reçues et la coordination de l'activité de l'organisme. Le SNC héberge des cellules particulièrement importantes que sont les neurones, qui constituent l'unité fonctionnelle du système nerveux. Ces cellules sont excitables ce qui leur permet de traiter et de transmettre l'information sous forme de signaux électriques et chimiques. Une caractéristique essentielle des neurones du cerveau adulte est qu'ils ne se divisent pas et ne peuvent être remplacés en cas de perte neuronale, bien qu'il y ait quelques exceptions. J'aborderai donc dans cette partie les propriétés immunologiques particulières attribuées au SNC, de la construction historique du concept de privilège immun aux caractéristiques qui le composent.

1.1 Historique du concept de privilège immun

Durant une grande partie du XX^e siècle, le SNC a été considéré comme immunologiquement inerte et séparé du système immunitaire périphérique. En effet, il était perçu comme un organe avec une capacité de renouvellement limitée, constitué de cellules post-mitotiques très vulnérables à l'assaut par les cellules immunitaires activées infiltrant le SNC. Le concept de privilège immun était donc initialement perçu comme une propriété indispensable du SNC afin de limiter les éventuelles réponses inflammatoires délétères.

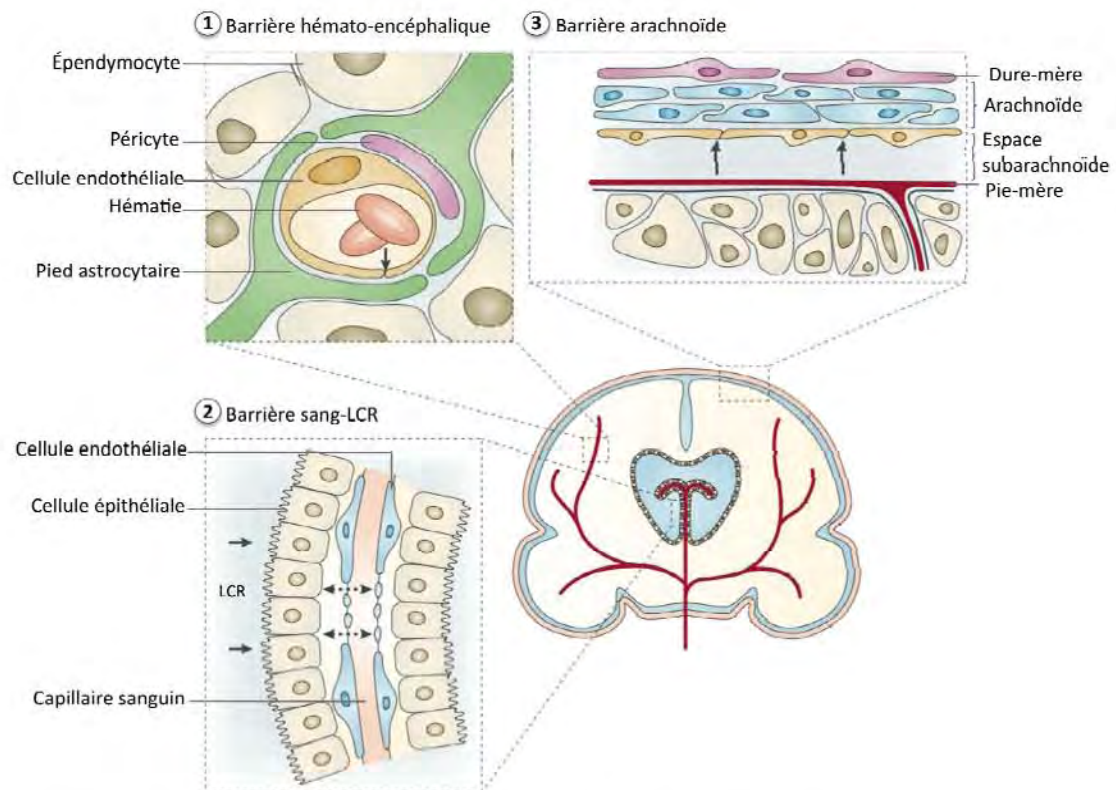


Figure 1 : Les différentes barrières du système nerveux central

Les cellules endothéliales des capillaires sanguins sont liées entre elles par des jonctions serrées (illustrées par la flèche). A l'extérieur se situe une membrane basale qui entoure également les macrophages périvasculaires ou péricytes. Cette structure est entourée par les pieds astrocytaires.

Les cellules endothéliales des plexus choroïdes sont fenestrées et forment une barrière non restrictive (illustrée par les flèches pointillées) entre le LCR et les capillaires sanguins. En revanche, les cellules épithéliales ont des jonctions serrées à leur pôle apical (illustrées par les flèches), qui restreignent le passage des molécules. Au niveau des méninges, les vaisseaux sanguins de la dure-mère sont fenestrés et ont un rôle de barrière limité. Cependant, les cellules de la membrane arachnoïde possèdent des jonctions serrées (illustrées par les flèches) et cette couche cellulaire forme une barrière physique entre l'espace subarachnoïde et la pie-mère.

D'après Neuwelt *et al.* 2011.

Ce concept a été défini expérimentalement dès 1921 par Shirai qui montra que des cellules tumorales de rat transplantées dans le parenchyme cérébral d'une souris pouvaient survivre et se multiplier, alors qu'elles étaient rejetées lorsqu'elles étaient implantées par voie sous-cutanée (Shirai, 1921). En 1923, Murphy et Sturm allèrent plus loin en démontrant que la transplantation de la rate du receveur associée à la greffe des cellules étrangères dans le cerveau permettait l'inhibition de la croissance tumorale (Murphy & Sturm, 1923). Ainsi, la survie de la tumeur dans le cerveau était liée à sa séparation avec le système immunitaire. Ces observations furent les premières indications de ce qui sera ensuite appelé "privilège immun" par Billingham and Boswell (Billingham & Boswell, 1953). Par la suite, ces observations ont été confirmées pour les greffes de tissu (Medawar 1948), les bactéries (Matyszak & Perry 1995) et les virus (Stevenson *et al.*, 1997) qui échappent tous à la reconnaissance immunitaire quand ils sont introduits dans le parenchyme cérébral.

A peu près à la même époque naquit le concept de barrière hémato-encéphalique (BHE). On a longtemps cru que le SNC était séparé du système immunitaire grâce à des barrières séparant le SNC du reste l'organisme (la périphérie) (Figure 1). Ceci eu pour conséquence l'attribution du privilège immun à la seule présence de la BHE. Le système immunitaire n'avait alors accès au SNC que lorsque celle-ci était rompue, comme par exemple à la suite de certaines infections ou lésions. Depuis cette hypothèse initiale, les preuves se sont accumulées montrant que les interactions entre système immunitaire et SNC sont bien plus complexes. En réalité, le privilège immun du SNC est une combinaison de mécanismes qui régulent activement les réponses adaptatives au sein du SNC.

1.2 La barrière hémato-encéphalique et la barrière sang-LCR

1.2.1 Historique du concept de barrière hémato-encéphalique

La première observation du phénomène de barrière entre le SNC et la périphérie fut effectuée par Paul Ehrlich en 1885 (Ehrlich, 1885). Il remarqua qu'à la

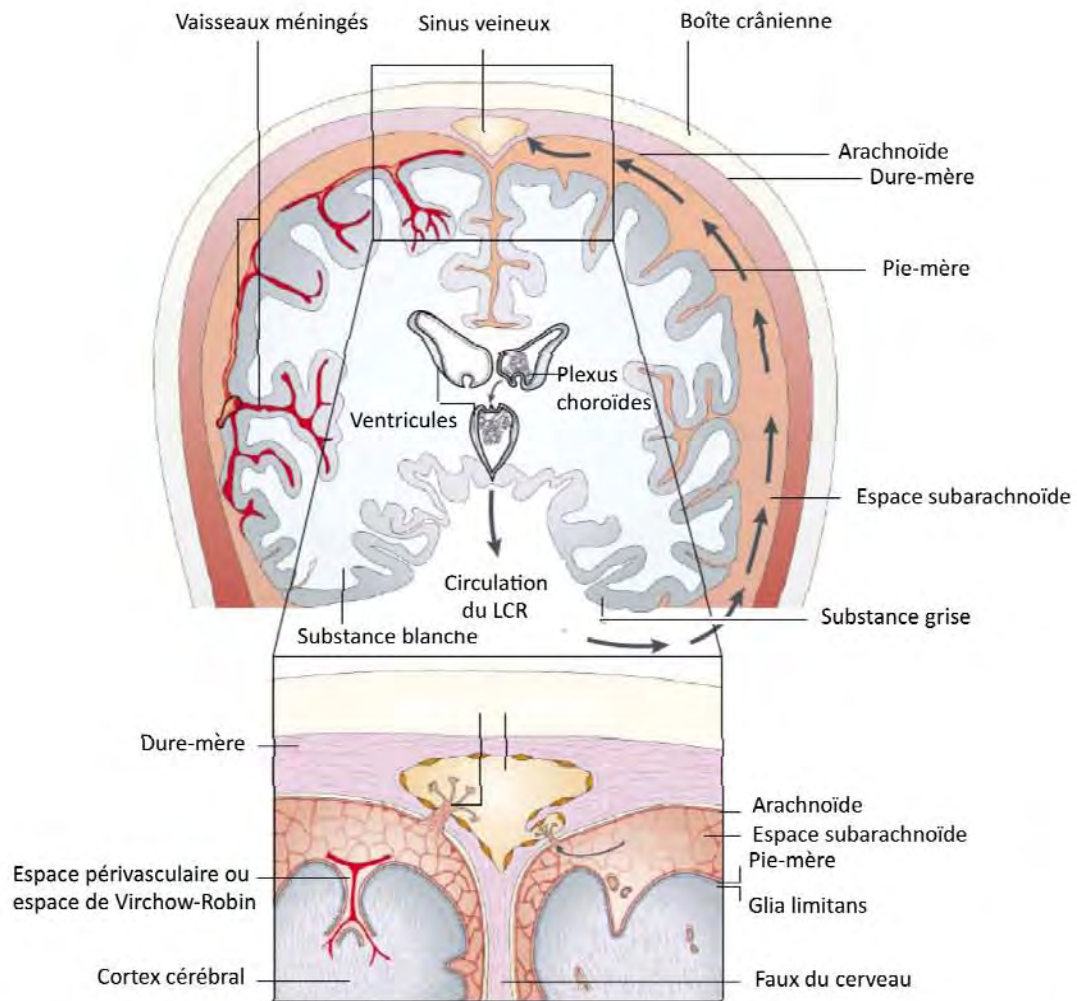


Figure 2 : Structures anatomiques impliquées dans la circulation sanguine et du LCR dans le SNC

La vascularisation artérielle du parenchyme cérébral est dérivée des branches terminales de l'artère carotide, suivant la surface du cerveau au niveau de l'espace subarachnoïde. En pénétrant dans le parenchyme cérébral, les vaisseaux sont initialement entouré d'un espace périvasculaire (ou espace de Virchow-Robin), qui est connecté à l'espace subarachnoïde.

Le LCR est activement sécrété par l'épithélium des plexus choroïdes, localisé au niveau des ventricules cérébraux. Le LCR circule ensuite des ventricules à l'espace subarachnoïde, localisé entre les membranes piale et arachnoïde, puis est absorbé à travers les villosités arachnoïdiennes dans le circulation sanguine.

D'après Ransohoff *et al.*, 2003.

suite d'une injection intraveineuse de colorant hydrophile, tous les organes étaient marqués à l'exception du cerveau. Cette propriété remarquable du SNC nécessitait une explication propre et de nombreux scientifiques essayèrent de comprendre ce qui bloquait le passage de molécules hydrophiles du sang vers le SNC. Trois études permirent de mieux comprendre la nature de cette barrière : les travaux de Lewandowski (Lewandowski, 1900) sur le liquide céphalo-rachidien (LCR), ceux de Goldmann (Goldmann, 1913) sur le marquage du SNC et ceux de Reese et Karnowski (Reese & Karnovsky, 1967) sur la localisation de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Ces travaux permirent de faire évoluer notre conception de la BHE, de celle d'une "surface aux propriétés remarquables" selon Ehrlich, jusqu'à la description de la machinerie moléculaire que forment les jonctions serrées, les canaux membranaires et les systèmes de transport.

Le terme de BHE fut introduit en 1900 par Lewandowski qui, à partir de ses propres expériences et des observations d'Ehrlich, conclut que "les capillaires du SNC doivent retenir certaines molécules". Pour illustrer ce phénomène, il définit le concept de "Bluthirnschranke" (barrière sang-cerveau en allemand) comme une barrière capillaire pour les solutés.

1.2.2 Propriétés de la barrière hémato-encéphalique

La BHE est une barrière sélective formée par les cellules endothéliales qui tapissent la microvasculature du SNC (Abbott *et al.*, 2006). Elles agissent comme une barrière physique grâce à la présence de jonctions serrées qui connectent les cellules endothéliales, empêchant la diffusion paracellulaire des molécules hydrophiles (Hawkins & Davis, 2005). En revanche, les petites molécules gazeuses telles que l'O₂ et le CO₂ peuvent diffuser librement à travers les membranes lipidiques. C'est également le cas pour les petites molécules lipophiles, comme les barbituriques ou l'éthanol.

La présence de systèmes de transport spécifiques régule le trafic transcellulaire des petites molécules hydrophiles, ce qui est en soi une barrière de transport, permettant ou facilitant l'entrée des nutriments nécessaires aux cellules

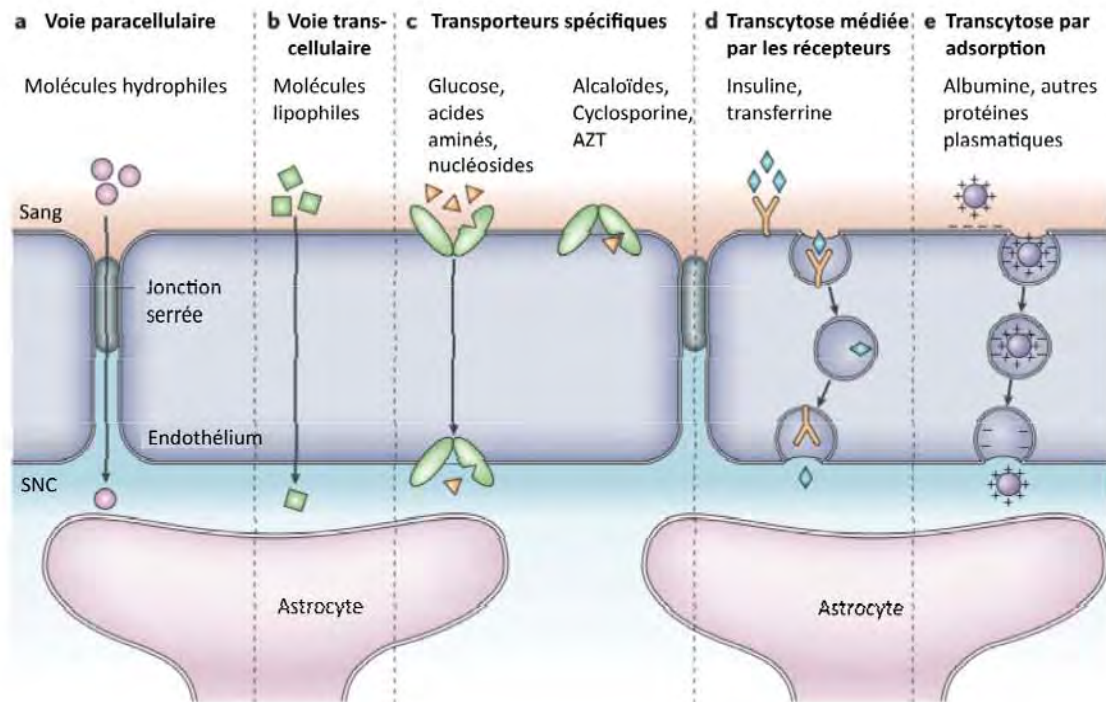


Figure 3 : Voies de passage à travers la barrière hémato-encéphalique

- a. Les jonctions serrées empêchent le passage des composés hydrophiles.
- b. En revanche, les agents lipophiles sont susceptibles de diffuser à travers les membranes lipidiques de l'épithélium.
- c. L'endothélium possède également des transporteurs spécifiques. Certains sont dépendants de l'ATP et agissent comme des pompes d'efflux.
- d. Certaines protéines, comme l'insuline et la transferrine, sont prises en charge par des mécanismes d'endocytose et de transcytose médiés par des récepteurs spécifiques.
- e. Les protéines du plasma comme l'albumine sont peu transportées à travers la BHE, mais leur cationisation peut augmenter leur passage par des mécanismes d'endocytose et de transcytose médiés par adsorption.

D'après Abbott *et al.*, 2006.

résidentes du SNC, tout en excluant les éléments potentiellement nocifs (Figure 3). Enfin, une combinaison d'enzymes intra et extracellulaires fournit une barrière métabolique : des ectoenzymes comme les peptidases et les nucléotidases sont capables de métaboliser les peptides et l'ATP, alors que les enzymes intracellulaires comme la monoamine oxydase et le cytochrome P450 peuvent inactiver des composés neurotoxiques (El-Bacha & Minn, 1999). Les grosses molécules hydrophiles, comme les peptides et les protéines, sont généralement exclues, à moins qu'elles puissent être transportées par des phénomènes de transcytose (Pardridge *et al.*, 1990).

Ainsi, la fonction, la machinerie biochimique et la morphologie des cellules endothéliales du réseau microvasculaire du SNC les différencient des autres cellules endothéliales de l'organisme.

Tous les capillaires du cerveau ne font pas partie de la BHE : les régions cérébrales qui sécrètent des hormones et celles qui ont une fonction sensorielle sur la composition du sang (par exemples les zones réceptrices de certaines hormones peptidiques) doivent rester en communication avec la circulation sanguine. On dénombre six organes circumventriculaires partiellement démunis de barrière hémato-encéphalique : l'épiphyse, l'éminence médiane, la neurohypophyse, l'area postrema, l'organe vasculaire de la lame terminale et l'organe subfornical possèdent des capillaires fenestrés (Duvernoy & Risold, 2007). L'organe subcommissural est le seul des organes circumventriculaires qui présente une barrière hémato-encéphalique. Pour protéger les tissus cérébraux avoisinants, les organes circumventriculaires sont entourés de tanocytes, des épendymocytes spéciaux, avec des jonctions serrées.

1.2.3 Propriétés de la barrière sang-LCR

De façon similaire à la BHE, les plexus choroïdes forment la barrière sang-LCR. Les plexus choroïdes consistent en un réseau de capillaires, séparés des ventricules par des cellules épithéliales cuboïdales entourant les capillaires. La

couche épithéliale des plexus choroïdes est continue avec la couche de cellules épendymaires qui borde les ventricules, mais contrairement à l'épendyme, les cellules épithéliales des plexus choroïdes sont interconnectées par des jonctions serrées à leur pôle apical, inhibant la diffusion paracellulaire de molécules hydrophiles du sang vers le LCR.

Les cellules épithéliales des plexus choroïdes produisent également le LCR. Celui-ci est synthétisé à partir du plasma filtré à travers les cellules épithéliales des plexus choroïdes. En plus de ce rôle, les plexus choroïdes servent de système de filtration, excréant les déchets métaboliques, les substances étrangères et les neurotransmetteurs en excès du LCR. Ces deux fonctions, de barrière et sécrétoire, sont maintenues grâce à l'expression de systèmes de transport spécifiques permettant le passage de nutriments au LCR et l'excrétion des agents potentiellement toxiques.

Par conséquent, combiné au fait qu'il s'agit d'un épithélium non-fenestré, avec une activité de pinocytose d'endocytose et de transcytose bien plus faible que les endothéliums de la périphérie, ces particularités morphologiques établissent la perméabilité physique des barrières hémato-encéphalique et sang-LCR.

1.3 Drainage des antigènes du SNC à la périphérie

Pour la plupart des lymphocytes T (LT) naïfs, le site de rencontre avec les antigènes (Ag) se situe au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Cependant, il est communément accepté que le SNC ne possède pas de système lymphatique (Ransohoff *et al.*, 2003). L'opinion générale étant que cette absence de système lymphatique prévient ainsi le drainage des Ag du SNC vers les nœuds lymphatiques cervicaux (NLC). Toutefois, les données recueillies ces dernières années semblent indiquer que les Ag solubles du SNC peuvent être drainés par le LCR vers les vaisseaux lymphatiques de la muqueuse nasale. Les éléments suggérant une connexion entre LCR et système lymphatique reposent sur la présence de connexions anatomiques entre les espaces subarachnoïdes et les bulbes olfactifs (Weller *et al.*, 1992). La pertinence physiologique de cette voie a été soulignée par l'étude de la migration de traceurs ou d'Ag marqués du parenchyme cérébral vers les

nœuds lymphatiques cervicaux (Boulton *et al.*, 1999).

Bien que le SNC ne possède pas de système lymphatique conventionnel, 50% de l'albumine radiomarquée injectée dans le noyau caudé est retrouvée au niveau des nœuds lymphatiques cervicaux profonds (Yamada *et al.*, 1991). Le drainage se fait le long des espaces périvasculaires des capillaires et artérioles, qui sont en continuité avec l'espace subarachnoïde (Ichimura *et al.*, 1991). A partir de là, le fluide est drainé vers les vaisseaux lymphatiques de la sous-muqueuse nasale et ainsi vers les NLC (Kida *et al.*, 1993). Dans une série d'expériences, Harling-Berg *et al.* ont démontré qu'un Ag injecté dans le parenchyme cérébral et les ventricules était drainé aux NLC, où il pouvait entraîner une réponse anticorps bien supérieure à celle obtenue après injection intra-veineuse ou intra-lymphatique, mais ne pouvait déclencher une DTH (Delayed Type Hypersensitivity) ou une réponse cytotoxique des lymphocytes T CD8 (LT CD8) (Harling-Berg *et al.*, 1999).

Les réponses B et/ou Th2 semblent donc être préférentiellement induites par les Ag drainés vers les NLC. Les Ag solubles n'ont peut être même pas à aller aussi loin que les NLC pour induire une réponse immune. Les cellules dendritiques (DC, pour "Dendritic Cell") présentes au niveau de régions ne bénéficiant pas du privilège immun, comme les méninges (Pashenkov, 2001), pourraient aussi capturer des Ag. Des DC marquées injectées dans le LCR atteignent les NLC, où elles s'accumulent préférentiellement au niveau des follicules de lymphocytes B (LB), favorisant une réponse humorale (Hatterer *et al.*, 2006). D'autre part, il existe des arguments en faveur d'un effet tolérogène des Ag solubles du SNC. Par exemple, l'injection intra-cérébro-ventriculaire de MBP (Myelin Basic Protein, une protéine constituante de la gaine de myéline) protège contre l'encéphalite autoimmune expérimentale (EAE) induite par injection de MBP en périphérie, un modèle d'encéphalite autoimmune de physiopathologie comparable à la sclérose en plaques (Harling-Berg *et al.*, 1991).

Par conséquent, contrairement aux autres tissus, le bras afférent de la réponse immune dans le cerveau est dépourvu d'une voie cellulaire pour le transport d'Ag et il est donc exclusivement dépendant du drainage par voie soluble.

Cette situation est également observée au niveau de la chambre antérieure de l'œil, un autre site de privilège immun (Dullforce *et al.*, 2004). Des cellules phagocytaires sont capables d'absorber un Ag marqué injecté dans la chambre antérieure de l'œil mais ne migrent pas au nœud lymphatique drainant. En revanche, de l'ovalbumine fluorescente injectée au même endroit est retrouvée au nœud lymphatique drainant (Dullforce *et al.*, 2004).

Il y a donc une dichotomie entre voie de transport cellulaire et humorale des Ag cérébraux vers le système immunitaire périphérique, ce qui est sans doute une des caractéristiques essentielles donnant naissance au privilège immun du SNC.

1.4 Les cellules présentatrices d'antigènes du SNC

L'initiation d'une réponse T ou même la rétention de lymphocytes T activés dans un tissu sont déterminées en partie par la nature des populations présentatrices d'Ag. Les Ag non solubles nécessitent un transport actif par une cellule présentatrice d'Ag (CPA) activée pour atteindre un nœud lymphatique. La capacité à ensuite stimuler la prolifération des lymphocytes, leur différenciation et la production de cytokines est extrêmement dépendante du statut d'activation de la CPA et des molécules de co-stimulation exprimées à sa surface.

Le premier prérequis est la présence d'une telle population au sein du SNC, capable de phagocyter des débris cellulaires, de migrer aux nœuds lymphatiques cervicaux et d'y générer une réponse T inflammatoire.

1.4.1 Infiltration possible du SNC par les cellules dendritiques

Les DC sont les CPA professionnelles de la plupart des réactions immunitaires. Bien que la présence de DC dans le parenchyme cérébral intact n'ait pas été observée, celles-ci sont présentes au niveau des méninges et des plexus choroïdes chez le rongeur (McMenamin, 1999). En revanche, il est devenu manifeste que des cellules exprimant des marqueurs de DC sont présentes dans le SNC de

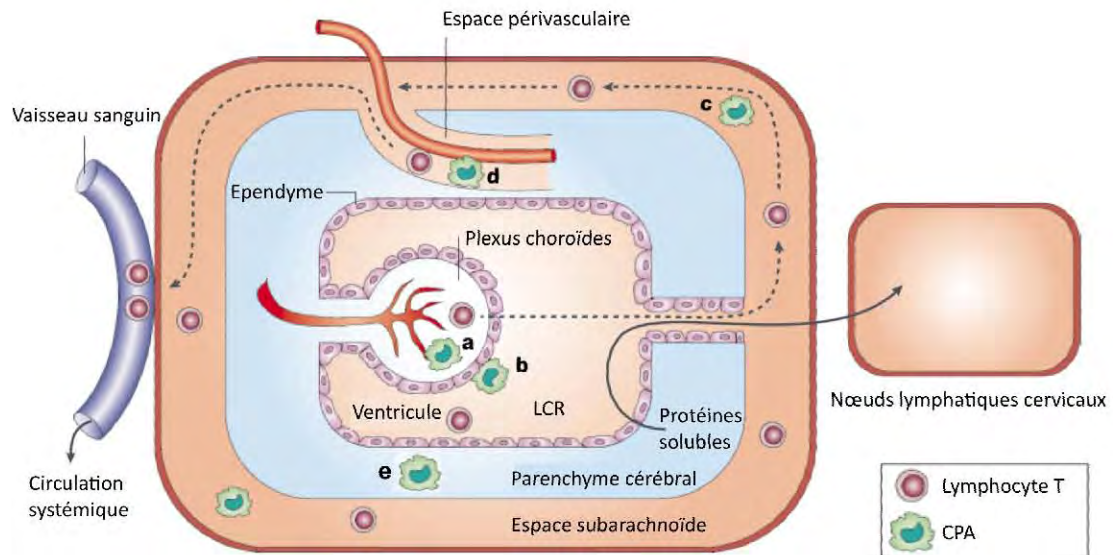


Figure 4 : Mécanismes afférents et efférents de surveillance du SNC

Les signaux afférents du parenchyme cérébral au système immunitaire en périphérie sont initiés par le drainage de protéines solubles au LCR. Celles-ci sont ensuite transportées par les vaisseaux lymphatiques aux nœuds lymphatiques cervicaux, permettant la stimulation des lymphocytes T. Les phases efférentes de la réponse immunitaire sont initiées dans les organes lymphoïdes secondaires. Les LT ainsi activés peuvent migrer du sang à l'espace subarachnoïde et revenir à la circulation sanguine (illustré par les flèches pointillées). Les CPA résidentes du SNC incluent : les macrophages des plexus choroïdes (a), les cellules épiplexuelles (b), les macrophages des méninges (c), les cellules périvasculaires ou péricytes (d) et les cellules microgliales (e).

D'après Ransohoff *et al.*, 2003.

rongeur en conditions inflammatoires, notamment lors d'infarctus cérébral (Reichmann *et al.*, 2002), de toxoplasmose cérébrale (Fischer *et al.*, 2000) et d'EAE (Matyszak & Perry, 1996; Serafini *et al.*, 2000).

Les DC peuvent être issues de monocytes ou de précurseurs lymphoïdes. Les deux types de DC, myéloïde et lymphoïde, ont été détectés dans le LCR humain en conditions inflammatoires, généralement suite à une méningite aiguë ou chronique (Pashenkov *et al.*, 2002). Ces DC expriment CCR5, un récepteur à chimiokines exprimé par les DC immatures (Sallusto *et al.*, 1998). En revanche, les DC contenant des Ag de la myéline, qui sont détectées dans les nœuds lymphatiques cervicaux de primates atteints d'EAE, sont CCR7⁺ indiquant un phénotype mature (de Vos *et al.*, 2002).

Ainsi, ces observations prises dans leur ensemble suggèrent que les DC peuvent migrer entre le SNC et la périphérie dans des conditions de neuroinflammation. Les conditions exactes de cette migration et/ou différenciation des DC dans le SNC restent cependant à élucider.

1.4.2 Cellules présentatrices d'antigènes résidentes du SNC

Si les DC ne sont pas présentes à l'état basal dans le parenchyme cérébral, d'autres cellules résidentes du SNC peuvent jouer le rôle de CPA. C'est le cas par exemple de la microglie.

Suite à une lésion, la microglie activée est capable de présenter de façon croisée ("cross-presentation") des Ag exogènes du SNC aux LT CD8, initiant ainsi la réponse immune de type T CD8, c'est à dire l'activation des LT CD8 en LT CD8 cytotoxiques ou CTL (Cytotoxic T Lymphocytes) (Frei *et al.*, 1987). En revanche, dans des conditions non-inflammatoires, l'activation de la microglie et notamment la présentation antigénique par le CMH-I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I) est finement régulée.

Ces phénomènes résultent notamment de l'intégrité des neurones du SNC : les neurones expriment constitutivement CD200 et CD47 qui interagissent avec leurs

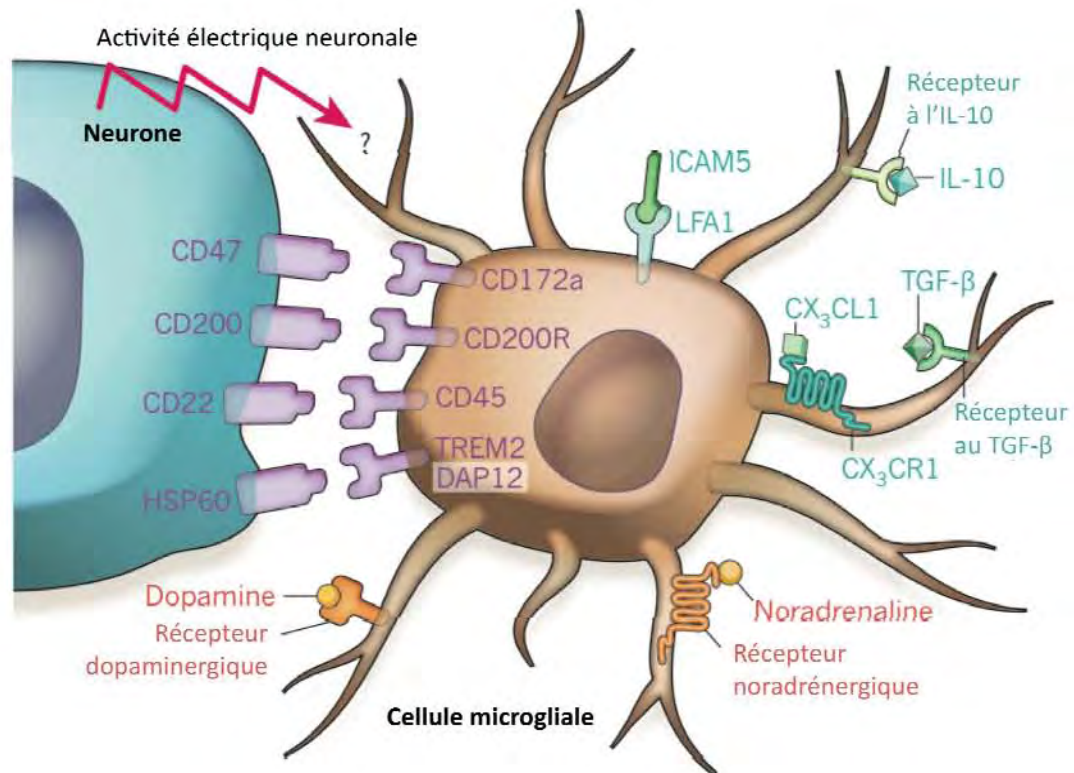


Figure 5 : Inhibition de la microglie par les neurones

Les neurones peuvent inhiber la microglie par différentes voies : l'inhibition dépendante du contact cellulaire (en violet), les cytokines inhibitrices solubles et les molécules d'adhésion et leurs récepteurs (en bleu) et les neurotransmetteurs inhibiteurs et leurs récepteurs (en rouge).

D'après Ransohoff & Cardona, 2010.

récepteurs CD200R et CD172A à la surface des cellules microgliales. Ces signaux permettraient de maintenir les cellules microgliales sous forme ramifiée, inactivée (Meuth *et al.*, 2008; Hoek *et al.*, 2000). De plus, les neurones électriquement actifs inhibent la présentation antigénique par la microglie, notamment grâce à la sécrétion de neurotrophines (Neumann *et al.*, 1998). Les neurones sécrètent également la chimiokine fractalkine (CR3CR1L) et CD22, les deux se liant à leur récepteur à la surface de la microglie (CR3CR1 et CD45, respectivement) et atténuant leur activation (Cardona *et al.*, 2006; Mott *et al.*, 2004) (Figure 5).

Enfin, il existe d'autres CPA résidentes du SNC: les macrophages des plexus choroïdes, les cellules de Kolmer (ou cellules épiplexuelles), les macrophages des méninges et les cellules périvasculaires de l'espace de Virchow-Robin (Figure 4).

1.5 Régulation de la neuroinflammation par des médiateurs solubles

De nombreuses observations suggèrent l'existence d'une régulation importante des réponses immunes dans le SNC. Cette régulation active inclut le contrôle fonctionnel de l'activation immunitaire des cellules résidentes du SNC et des cellules migrant dans le SNC. Plusieurs mécanismes régulateurs sont impliqués et tendent à inhiber la prolifération des LT et favoriser la production de cytokines de type 2.

1.5.1 Rôle des cytokines dans la régulation de la neuroinflammation

Le milieu cytokinique du SNC en conditions inflammatoires est complexe et dynamique, favorisant la réponse immunitaire afin d'éliminer les pathogènes, tout en inhibant les réponses immunes délétères. Dans le SNC inflammé, les cytokines capables de promouvoir les LT effecteurs, telles que l'IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 et le TGF- β , sont produites par de nombreux types cellulaires.

1.5.1.1 Rôle des cytokines anti-inflammatoires, TGF- β et IL-10

Le TGF- β est produit aussi bien dans le cerveau sain que dans le cerveau en conditions inflammatoires (Logan *et al.*, 1992). Des données récentes montrent que les neurones, comme les astrocytes, sont capables de sécréter du TGF- β , convertissant ainsi les lymphocytes T activés avec lesquels ils rentrent en contact, en lymphocytes T régulateurs, indépendamment de leur spécificité antigénique (Liu *et al.*, 2006). Toutefois, le TGF- β a un rôle paradoxal dans la régulation de la réponse immune adaptative au sein du SNC. En effet, l'expression de TGF- β seul facilite l'inflammation dans le cerveau, comme démontré dans le modèle de l'EAE chez la souris. Ainsi, les signes cliniques de la maladie sont exacerbés chez un animal dont les astrocytes surexpriment le TGF- β . A contrario, l'inhibition pharmacologique du TGF- β améliore l'EAE (Wyss-Coray *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 2007).

L'IL-10 joue également un rôle crucial dans la suppression des réponses T dans le SNC. Des souris déficientes en IL-10 développent une EAE plus sévère, alors que des souris surexprimant l'IL-10 sont résistantes à la maladie (Bettelli *et al.*, 1998). Les LT régulateurs sont une source d'IL-10 mais l'IL-27 peut aussi induire la production d'IL-10 par les T_H1 et les LT CD8 (Stumhofer *et al.*, 2006; Fitzgerald *et al.*, 2007).

1.5.1.2 Rôle d'autres médiateurs solubles

L'IL-27, produite par les DC activées et les macrophages infiltrants, appartient à la même famille de cytokines que l'IL-6 et l'IL-12. L'IL-27 inhibe le développement des cellules productrices d'IL-17 (Batten *et al.*, 2006). Une déficience en IL-27 entraîne une EAE sévère (Batten *et al.*, 2006) alors qu'un traitement par l'IL-27 recombinante supprime la phase effectrice de la maladie (Fitzgerald *et al.*, 2007).

Il existe également d'autres voies cytokiniques permettant de modérer la réponse des LT effecteurs. Par exemple, l'IL-25 exprimée par la microglie agit en supprimant la production par les DC activées des cytokines polarisantes des T_H17 (IL-23, IL-1 β et IL-6) (Kleinschek *et al.*, 2007). Les LT infiltrants sont aussi capables

d'induire la production d'indolamine 2,3-dioxygénase (IDO) par la microglie (Kwidzinski *et al.*, 2005), permettant la libération de kynurenine, un métabolite du tryptophane qui atténue la prolifération et la production de cytokines par les LT CD8 et CD4 (Kwidzinski *et al.*, 2005).

1.5.2 Rôle de molécules spécifiques du SNC

Enfin, le SNC possède des mécanismes immunomodulateurs très spécifiques puisqu'il a été montré que certaines molécules bien connues pour leur activité neurobiologique peuvent également affecter le système immunitaire.

Ainsi, l' α B cristalline, une protéine présente au niveau du cristallin de l'œil, s'avère avoir des transcrits très abondants au niveau des lésions de sclérose en plaques précoce. Il a été démontré que cette protéine est capable à la fois d'inhiber les cellules inflammatoires et de protéger les cellules gliales de l'apoptose (Frumento *et al.*, 2002).

De façon similaire, certains neurotransmetteurs semblent avoir un effet immunosuppresseur. C'est le cas de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), le principal neurotransmetteur inhibiteur du cerveau. En effet, les LT expriment des récepteurs GABA capables d'être activés à des concentrations physiologiques, entraînant une diminution de leur prolifération (Bjurstöm *et al.*, 2008).

De façon intéressante, il a été également observé que la stimulation du nerf vague pouvait atténuer une réponse inflammatoire. L'acétylcholine, principal neurotransmetteur du système nerveux parasympathique, inhibe la libération par les macrophages de cytokines proinflammatoires, telles que l'IL1, l'IL-6, l'IL-18 et le TNF- α , sans altérer la production de cytokines anti-inflammatoires (Borovikova *et al.*, 2000).

Bien que l'inhibition induite par les cytokines des réponses T dans le SNC soit importante dans le contrôle des réponses inflammatoires, l'apoptose des LT infiltrant est un autre mécanisme essentiel afin de limiter les réponses immunes adaptatives dans le SNC.

1.6 Régulation de la neuroinflammation par des ligands membranaires

Les LT activés pénétrant dans l'espace périvasculaire rentrent souvent en apoptose après interaction avec les CPA.

1.6.1 Rôle du système Fas/FasL au sein du SNC

L'expression constitutive de Fas ligand (FasL, CD95L) par les cellules résidentes du SNC (Choi *et al.*, 1999) permet d'induire l'apoptose par contact cellulaire des LT activés exprimant Fas (CD95) (Bechmann *et al.*, 1999). Ce phénomène n'est pas dépendant de la spécificité antigénique ou du statut d'activation du LT (Bauer *et al.*, 1998). Le système Fas-FasL représente donc une barrière immunologique aspécifique contre la cytotoxicité des CTL dans le SNC.

Ce système a sans doute aussi un rôle neuroprotecteur important en favorisant la survie neuronale. En effet, l'engagement de Fas peut stimuler la repousse axonale après axotomie, au lieu d'entraîner l'apoptose neuronale (Lambert *et al.*, 2003). D'autres arguments en faveur de la contribution de Fas à la survie neuronale viennent de l'étude des souris lpr. Ces souris, qui sont déficientes en Fas, présentent des déficits cognitifs, moteurs et sensoriels, ainsi qu'une atrophie progressive des dendrites des neurones pyramidaux et une régénération retardée des neurites (Hikawa *et al.*, 1997). La plupart des constatations neurologiques chez la souris lpr ont été attribuées à une maladie autoimmune proche du lupus qu'elles développent (Desbarats *et al.*, 2003; Pettmann & Henderson, 2003). Cependant, l'usage d'immunosuppresseurs n'empêche pas le développement de manifestations neurologiques chez ces souris. En outre, les troubles neurologiques précèdent l'apparition de l'autoimmunité. Prises dans leur ensemble, ces données suggèrent que la neurodégénérescence observée chez les souris lpr aurait une étiologie génétique et pourrait résulter directement de l'absence d'expression de Fas dans le SNC.

1.6.2 Rôle des molécules inhibitrices de la famille B7

Il existe d'autres molécules membranaires possédant un effet immunorégulateur dans le SNC. Par exemple, les cellules du SNC expriment les molécules inhibitrices de la famille B7. En conditions inflammatoires, leur expression est stimulée et elles interagissent alors avec les récepteurs lymphocytaires PD-1 (Programmed-Death receptor-1) et CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4) afin d'inhiber l'activation et la sécrétion de cytokines par les LT. Il a été démontré que les neurones (Hess *et al.*, 1993; Hikawa *et al.*, 1997; Sakić *et al.*, 1998) ainsi que les astrocytes (Sakić *et al.*, 1998) sont capables de convertir les LT effecteurs en LT régulateurs par cette voie, ce phénomène étant dépendant d'un contact cellulaire mais pas de l'antigène.

1.6.3 Rôle des gangliosides

Les gangliosides, des glycophospholipides présents de façon abondante dans le SNC, inhibent l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II par les astrocytes, ainsi que la production d'IL-2 et la prolifération des LT dans le parenchyme cérébral. L'activité immunorégulatrice des gangliosides cérébraux sur les LT est liée en partie à la suppression de l'activité NF- κ B (Hess *et al.*, 1993). Les LT issus de souris susceptibles aux maladies autoimmunes du SNC provoquées par les T_H1 (comme l'EAE) sont moins sensibles à cet effet immunorégulateur des gangliosides cérébraux que les LT issus de souris résistantes à l'EAE (Lafon *et al.*, 2008; Ortler *et al.*, 2008; Magnus *et al.*, 2005).

1.7 Expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) au sein du SNC

Pour exercer leur activité cytolytique, les LT CD8 doivent reconnaître les peptides antigéniques, en association avec les molécules du CMH-I qui sont présentées à la surface des cellules. Cependant, les molécules de CMH-I classiques ne sont pas exprimées constitutivement par les cellules résidentes du SNC, bien qu'il

Type	Localisation	Phénotype	Fonctions immunologiques	Conséquences de l'interaction avec les LT
Macrophages des plexus choroïdes	Plexus choroïdes	Similaire aux DC: expriment des molécules du CMH-II et de costimulation	Présentent les Ag dérivés de la circulation périphérique aux LT , permettant leur restimulation quand ils passent dans le LCR	Interagissent avec les LT qui passent du sang au LCR Défense contre les bactéries extracellulaires Facilitent l'activation de la vasculature de la BHE
Macrophages méningés	Associés à la vasculature de la pie-mère et le stroma de l'espace subarachnoïde	Expriment principalement des molécules du CMH-II	Présentent des Ag dérivés de la destruction de cellules du SNC aux LT, permettant leur restimulation quand ils traversent le LCR	Interagissent avec les LT du LCR Défense contre les virus et les tumeurs Facilitent l'activation de la vasculature de la BHE
Macrophages périvasculaires	Au niveau des espaces périvasculaires du parenchyme, soit du côté parenchymal ou vasculaire de la glial limitans	Expriment des molécules du CMH-II et de costimulation	Restimulent les LT effecteurs qui sont passés au travers les capillaires sanguins	Interagissent avec les LT des espaces périvasculaires et promeuvent ainsi l'invasion du parenchyme pendant la phase effectrice
Microglie du parenchyme	Dans le parenchyme, à proximité des unités neurovasculaires mais pas directement associée aux vaisseaux.	Expriment des molécules cytosoliques du CMH-II plutôt que membranaires	Source potentiel de phagocytes Produisent des effecteurs antibactériens par bouffée oxydante Produisent des cytokines	interagissent avec les LT du parenchyme La plupart des interactions s'effectue à distance, par la réponse aux cytokines sécrétées par les LT et ne sont pas spécifiques de l'Ag

Table 1 : Localisation et fonctions immunologiques des phagocytes du SNC

D'après Ruckenstein *et al.*, 1999.

soit démontré que leur expression est induite dans la plupart des maladies neurodégénératives ou neuroinflammatoires. Des LT CD8 infiltrant le SNC sain ne peuvent donc rencontrer des cellules exprimant le complexe CMH-I/peptide qu'au niveau des méninges, des plexus choroïdes et des espaces de Virchow-Robin, mais pas dans le parenchyme cérébral (Liu *et al.*, 2006) (Table 1 et Figure 4). Néanmoins, des conditions traumatiques ou pathologiques peuvent modifier cet environnement, le rendant plus susceptible à l'apparition d'une réponse immune. Les cellules gliales et les neurones sont donc potentiellement capables d'exprimer le CMH-I, les rendant théoriquement susceptibles à l'attaque par les CTL (Trajkovic *et al.*, 2004). Toutefois, la capacité d'expression de CMH-I, de présentation antigénique et donc la susceptibilité à l'attaque par les LT CD8 varient entre les types cellulaires du SNC.

1.7.1 Expression du CMH-I par la microglie

La microglie demeure à l'état quiescent dans le SNC sain, n'exprimant pas de molécules du CMH-I et -II ou de molécules de costimulation comme CD86 et CD40 (Irani, 1998; Irani *et al.*, 1996; Massa, 1993). En revanche, suite à une lésion traumatique ou infectieuse du SNC, la microglie passe à un phénotype activé, exprimant les molécules du CMH et de costimulation. *In vitro*, les cellules microgliales primaires et les lignées de cellules microgliales sont relativement inefficaces à la présentation par le CMH-I, bien qu'elles puissent être détruites quand un LT CD8 reconnaît un complexe CMH-I/peptide spécifique à leur surface. Toutefois, même après activation *in vitro*, le niveau d'expression des molécules de CMH et de costimulation par la microglie est beaucoup plus faible que celui d'une CPA professionnelle (Irani, 1998).

1.7.2 Expression du CMH-I par les astrocytes

Les astrocytes en culture expriment constitutivement le CMH-I, dont l'expression peut être augmentée par l'IFN- γ . Ils peuvent être lysés par libération de granules lytiques par les CTL reconnaissant leur Ag (Vass & Lassmann, 1990).

En outre, les astrocytes sont également susceptibles à l'apoptose induite par Fas (Neumann *et al.*, 1995).

1.7.3 Expression du CMH-I par les oligodendrocytes

Des études ont démontré que des oligodendrocytes humains exprimant le CMH-I sont susceptibles à l'attaque alloréactive de CTL isolés du sang (Ruijs *et al.*, 1990 ; Jurewicz *et al.*, 1998). Il a été également observé que des oligodendrocytes isolés à partir de tissus *post mortem* peuvent exprimer le CMH-I. En revanche, les oligodendrocytes n'expriment pas de molécules de co-stimulation et sont donc incapables d'induire l'activation des LT bien qu'ils puissent être la cible de LT CD8 préalablement activés.

1.7.4 Expression du CMH-I par les neurones

Les neurones ont été considérés pendant longtemps comme immunologiquement inertes. Jusqu'à récemment, il était communément admis que les neurones n'exprimaient pas de CMH-I et qu'ils étaient donc épargnés de l'attaque par les CTL (Lampson, 1995 ; Joly *et al.*, 1991 ; Neumann *et al.*, 1997 ; Rall *et al.*, 1995, Oliveira *et al.*, 2004). Il a été proposé que les neurones expriment le CMH-I seulement quand ils sont électriquement inactifs (Neumann *et al.*, 1997; Rall *et al.*, 1995), c'est-à-dire en conditions pathologiques. En outre, les neurones sont capables d'exprimer le CMH-I après traitement par l'IFN- γ (Neumann *et al.*, 1995; Neumann *et al.*, 1997; Rensing-Ehl *et al.*, 1996), bien que l'expression des molécules du CMH-I soit plus strictement régulée dans les neurones que dans n'importe quel autre type cellulaire (Neumann, 2001). Le blocage de l'activité électrique par la tétrodotoxine (TTX) potentialise encore l'expression du CMH-I par l'IFN- γ (Neumann *et al.*, 1995).

De plus, la microglie activée *in vitro* inhibe l'excitabilité des neurones en augmentant les courants potassium (Wang *et al.*, 2008), induisant potentiellement l'expression du CMH-I. Les LT CD8 sont également capables de sécréter des cytokines proinflammatoires et d'inactiver électriquement les neurones, et pourraient donc

par eux mêmes induire l'expression du CMH-I neuronal (Na *et al.*, 2008).

Plusieurs études *in vitro* ont été réalisées afin d'analyser la susceptibilité de neurones traités par l'IFN- γ et la TTX à des CTL (Rensing-Ehl *et al.*, 1996; Rall *et al.*, 1995). Les neurones d'hippocampe apparaissent très susceptibles à l'application directe de granules lytiques bien qu'il n'y ait pas de signes de dommages membranaires après l'attaque par des CTL (Medana *et al.*, 2001). Cependant, il est important de noter que dans ces expériences, les neurones d'hippocampe de fœtus de rongeur sont dissociés, cultivés *in vitro* et traités à l'IFN- γ et à la TTX afin d'exprimer le CMH-I artificiellement.

L'expression des molécules du CMH-I a été observée dans de nombreuses pathologies neuroinflammatoires telles que la sclérose en plaques (SEP) (Höftberger *et al.*, 2004), la leucoencéphalopathie multifocale progressive (LEMP) (Achim & Wiley, 1992) et l'encéphalite de Rasmussen (Bien *et al.*, 2002) mais également dans quelques maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Itagaki *et al.*, 1988; Town *et al.*, 2005). De plus, l'augmentation de l'expression des ARNm codant la chaîne lourde du CMH-I, la β 2-microglobuline (β 2m) et les transporteurs associés à l'apprêtement des Ag (TAP1 et TAP2) est observée suite à une infection (Höftberger *et al.*, 2004). Toutefois, la capacité des neurones à pouvoir exprimer des molécules du CMH-I matures à leur surface est encore sujette à controverse (Kimura & Griffin, 2000). La β 2m, qui est parfois détectée à la surface des neurones, pourrait être associée à des molécules non classiques plutôt qu'à des molécules classiques du CMH-I.

Une régulation fine de l'expression des gènes du CMH-I dans les neurones a lieu durant le développement du SNC (Corriveau *et al.*, 1998). Ainsi, l'expression des ARNm codant le CMH-I peut être diminuée dans les neurones en bloquant simplement la vision d'un œil durant les premiers jours de vie. Réciproquement, après une crise induite par le kainate, l'expression d'ARNm codant le CMH-I est augmentée dans les neurones de l'hippocampe adulte. Prises dans leur ensemble, ces observations démontrent clairement que les neurones du SNC sain peuvent

exprimer le CMH-I, son expression étant finement régulée par l'activité neuronale et corrélée avec la plasticité synaptique. Le CMH-I joue donc également un rôle non-immunologique dans le SNC puisqu'il est important dans le neurodéveloppement.

En conclusion, nous avons vu que le SNC est un organe comportant divers types cellulaires, dont les neurones qui ont la particularité d'avoir une capacité de renouvellement très limitée. De ce fait, le SNC se distingue des organes périphériques par ses propriétés immunologiques très particulières. Bien qu'il ait été longtemps considéré comme immunologiquement privilégié, ce concept a beaucoup évolué au fur et à mesure de la compréhension des mécanismes régissant ce "privilège". Dans tous les points traités, il apparaît que ses caractéristiques anatomiques ou biochimiques ne sont pas absolues mais plastiques et évolutives, notamment dans un contexte inflammatoire. En particulier, si les réponses inflammatoires au sein du SNC sont effectivement relativement contrôlées, ce "privilège immun" n'est pas un isolement strict du système immunitaire.

Virus à ADN	Sigle	Famille	Cibles principales dans le SNC
Herpès simplex virus	HSV-1 (HHV-1)	<i>Herpesviridae</i>	Neurones
Virus de la roséole	HHV-6 et HHV-7	<i>Herpesviridae</i>	Oligodendrocytes
Cytomegalo virus	CMV (HHV-5)	<i>Herpesviridae</i>	Neurones
Virus de la varicelle	VZV (HHV-3)	<i>Herpesviridae</i>	Neurones trigéminaux
Virus JC	JCV	<i>Polyomaviridae</i>	Oligodendrocytes, neurones
Adenovirus	AdV	<i>Adenoviridae</i>	Neurones, ependymocytes
Virus à ARN			
Poliovirus	PV	<i>Picornaviridae</i>	Motoneurones
Virus coxsackie	CV	<i>Picornaviridae</i>	Cellules méningées
ECHO virus	E	<i>Picornaviridae</i>	Cellules méningées
Enterovirus 71	EV71	<i>Picornaviridae</i>	Neurones
Virus de la fièvre jaune	YFV	<i>Flaviviridae</i>	Neurones
Virus du Nil occidental	WNV	<i>Flaviviridae</i>	Neurones
Virus Kunjin	KUNV	<i>Flaviviridae</i>	Neurones
Virus de la dengue	DENV	<i>Flaviviridae</i>	Neurones
Virus de l'encéphalite japonaise	JEV	<i>Flaviviridae</i>	Neurones
Virus de l'encéphalite de St Louis	SLEV	<i>Flaviviridae</i>	Neurones
Virus de l'encéphalite de la Murray Valley	MVEV	<i>Flaviviridae</i>	Neurones
Virus de l'encéphalite à tique	TBEV	<i>Flaviviridae</i>	Neurones
Virus de l'encéphalite équine de l'Est	EEEV	<i>Togaviridae</i>	Neurones
Virus de l'encéphalite équine vénézuélienne	VEEV	<i>Togaviridae</i>	Neurones
Virus de l'encéphalite équine de l'Ouest	WEEV	<i>Togaviridae</i>	Neurones
Virus de Sindbis	SINV	<i>Togaviridae</i>	Neurones
Virus de la rubéole	RUBV	<i>Togaviridae</i>	Neurones
Virus des oreillons	MuV	<i>Paramyxoviridae</i>	Cellules méningées, ependymocytes
Virus de la rougeole	MeV	<i>Paramyxoviridae</i>	Cellules méningées, ependymocytes
Virus Hendrah	HeV	<i>Paramyxoviridae</i>	Neurones
Virus Nipah	NIV	<i>Paramyxoviridae</i>	Neurones
Virus de la rage	RABV	<i>Rhabdoviridae</i>	Neurones
Virus de la stomatite vésiculaire	VSV	<i>Rhabdoviridae</i>	Neurones
Virus de La Crosse	LCV	<i>Bunyaviridae</i>	Neurones
Virus de la chorioméningite lymphocytaire	LCMV	<i>Arenaviridae</i>	Cellules méningées, ependymocytes
Virus de Junin	JV	<i>Arenaviridae</i>	Neurones et astrocytes
Retrovirus			
Virus de l'immunodéficience humaine	HIV	<i>Retroviridae</i>	Microglie
Virus T-lymphotropique humain type 1	HTLV-1	<i>Retroviridae</i>	Astrocytes

Table 2 : Virus susceptibles d'infecter le SNC chez l'homme

2 La réponse immunitaire antivirale au sein du système nerveux central

Les infections virales du SNC ont plusieurs caractéristiques communes. La réponse immunitaire suite à l'infection se déroule en plusieurs étapes qui commencent par la mise en place de la réponse immunitaire innée du SNC dès que la présence du virus est détectée. Cette phase est suivie par le développement d'une réponse immunitaire adaptative, liée à l'infiltration du SNC par les lymphocytes et monocytes venant de la périphérie. Une fois le virus éliminé ou sa réplication contrôlée, il y a ensuite une extinction partielle ou complète de l'inflammation médiée par le système immunitaire.

Dans cette partie, je décrirai d'abord brièvement les différents virus susceptibles d'infecter le SNC humain ainsi que les modèles animaux d'étude de la réponse immunitaire antivirale au sein du SNC, que je décrirai ensuite dans les sous-parties suivantes.

2.1 Virus et système nerveux central

2.1.1 Infections virales du SNC chez l'homme

De nombreux virus sont susceptibles d'infecter le SNC et de provoquer diverses pathologies chez l'homme (Table 2).

La plupart des virus à ARN se répliquent seulement dans le cytoplasme et n'établissent pas de "vraie" latence. Certains peuvent causer des méningo-encéphalites foudroyantes, notamment le virus de l'encéphalite japonaise (JEV), le virus du Nil Occidental (WNV), le virus de la fièvre jaune (YFV) et le virus de la rage (RABV).

Les virus à ADN qui infectent le SNC ont une étape de leur cycle de réplication qui s'effectue dans le noyau cellulaire et ont souvent la capacité d'y persister sous forme latente (donc indétectable par le système immunitaire), que ce

soit en s'intégrant au génome de l'hôte ou se maintenant sous forme épisomale. Des virus tels que le virus herpes simplex (HSV-1), le virus JC (JCV), le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) et le virus T lymphotrope humain (HTLV-1) sont la cause fréquente de pathologies graves, notamment chez les individus immunodéprimés, de par leur capacité à se réactiver quand la réponse immunitaire est déficiente.

2.1.2 Invasion du SNC par les virus

2.1.2.1 Entrée dans l'organisme

Les virus pénètrent dans l'organisme par différentes voies d'entrée (McGavern & Kang, 2011). Le virus de l'herpès et HIV peuvent passer à travers les muqueuses génitales ou buccales, alors que les virus coxsackie, le poliovirus, les entérovirus et les ECHOvirus passent à travers la muqueuse gastrointestinale. La piqûre par un insecte vecteur, le plus souvent un moustique, peut transmettre un arbovirus comme les *flaviviridae*, les *togaviridae* et les *bunyaviridae*. De même, la morsure d'un animal enragé peut transmettre le virus de la rage. Le sang contaminé est probablement la seule voie d'entrée pour les virus neurotropes comme HIV, HTLV-1, HTLV-2, le cytomégalovirus (CMV) et WNV pour directement accéder au sang. Les infections du tractus respiratoire comme les oreillons, la rougeole et la rubéole sont connus pour emprunter une voie nerveuse d'entrée au cerveau.

Dans tous les cas, les virus doivent contourner la BHE pour atteindre le SNC (Figure 6). Un "tendon d'Achille" de la protection du SNC est l'existence de projections neuronales qui passent au travers de la BHE et connectent fonctionnellement les organes et tissus périphériques avec les somas neuronaux. Les molécules présentes au niveau des terminaisons nerveuses peuvent alors servir de récepteurs pour certains virus afin de pénétrer dans l'axone. Ils sont alors en mesure de recruter des composants du trafic axonal pour se déplacer jusqu'au soma neuronal. Parmi les virus utilisant le transport axonal afin d'atteindre le SNC, citons le poliovirus, RABV, les Herpesvirus, WNV, le virus de Theiler (TMEV), le virus des oreillons, le virus de Borna (BDV) et l'entérovirus 71 (Et71).

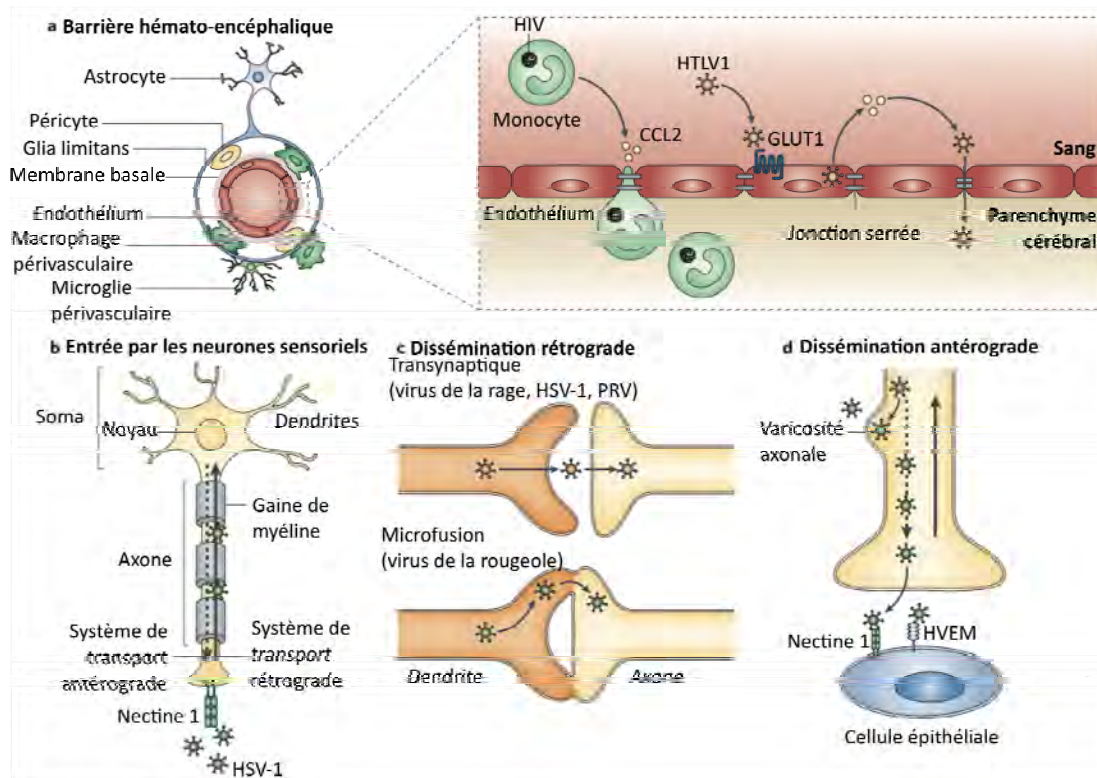


Figure 6 : Entrée des virus dans le SNC

a. Bien que la BHE protège normalement le SNC des pathogènes, les virus ont développés des stratégies d'invasion par la voie hématologique et axonale. Certains virus, comme le HIV, utilise la stratégie du "cheval de Troie" en infectant des monocytes qui traversent la BHE, notamment grâce à la chimiokine CCL2. D'autres virus comme HTLV1 se lie au récepteur endothéliale GLUT1, permettant l'infection de l'endothélium. **b.** L'invasion du SNC peut aussi s'effectuer par l'infection des neurones en périphérie. HSV-1 se lie ainsi à la nectine 1, exprimée au niveau des axones. La dissémination virale est ensuite assurée par transport rétrograde. **c.** Le virus de la rage, PRV et HSV-1 sont libérés à la synapse et utilisent une voie transynaptique rétrograde pour infecter le neurone afférent. Le virus de la rougeole se dissémine à l'aide de microfusions entre neurones adjacents. **d.** Dans le cas d'HSV-1, la transport antérograde peut entrainer l'infection des cellules environnantes lorsque le virus est libéré au niveau de varicosités axonales. Lors de la réactivation du virus, HSV-1 utilise cette voie pour atteindre les termini axonaux et réinfecter les cellules épithéliales en se liant à la nectine 1 ou HVEM (HerpesVirus Entry Mediator). D'après McGavern & Kang, 2011.

D'autre part, certains virus, comme le HIV, peuvent traverser la BHE en infectant des cellules du système immunitaire en périphérie, qui migreront ensuite au SNC, une stratégie dite du "cheval de Troie".

Il est intéressant de noter ici que ces virus atteignent le SNC à partir de la périphérie. Les cellules immunitaires peuvent donc être activées dans les nœuds lymphatiques drainant le site d'infection, suggérant que les réponses immunitaires adaptatives contre les virus neurotropes sont initiées avant même que la réponse immunitaire innée soit déclenchée dans le SNC suite à l'infection ; un concept confirmé expérimentalement (Savarin & Bergmann, 2008).

2.1.2.2 Entrée dans les neurones par la périphérie

Pour atteindre le SNC, les virus neurotropes peuvent pénétrer par différents types de terminaisons nerveuses, comme les terminaisons neurosensorielles ou les jonctions neuromusculaires (JNM) après des lésions de la peau ou musculaires (Figure 7). Les JNM sont des synapses spécialisées qui connectent les motoneurones aux fibres musculaires, formant une unité motrice. L'infection par ce biais a été décrite chez la souris et le primate pour le poliovirus (Racaniello, 2006; Ohka *et al.*, 1998) et le virus de la rage (Lewis *et al.*, 2000). Bien que le transport du virus de la rage ait été reporté dans les motoneurones et les neurones sensoriels, les données chez le rongeur et le primate suggèrent que les JNM pourraient être le point d'entrée du virus de la rage. Cela est probablement dû à la présence de récepteurs d'entrée du virus de la rage à la JNM, les molécules d'adhésion neurale (NCAM, Neural Cell Adhesion Molecules) et les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (nAChR) (Ugolini, 2008).

En revanche, les terminaisons neurosensorielles sont la voie principale d'entrée des herpesvirus au SNC (Diefenbach *et al.*, 2008). Le virus de Borna (BDV) infecte également les neurones au niveau de l'épithélium olfactif, riche en terminaisons neurosensorielles (de la Torre, 2002). Toutefois, le récepteur du BDV est encore inconnu à ce jour.

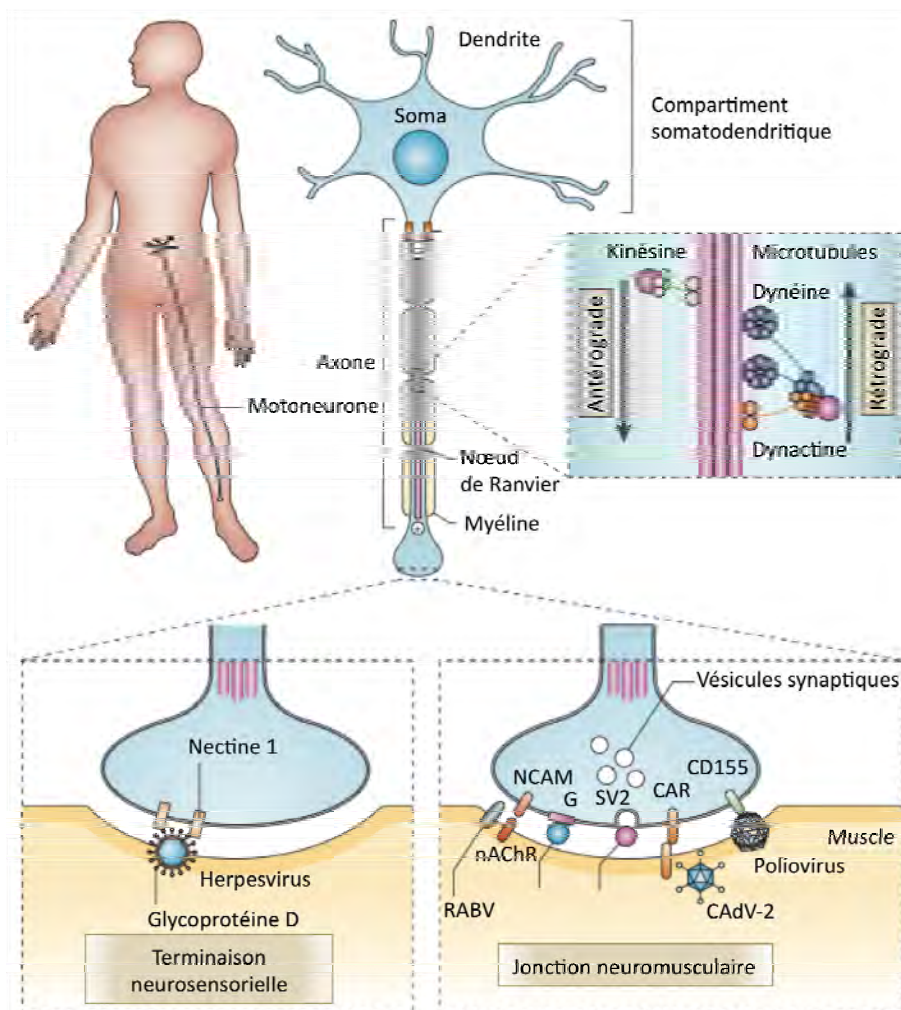


Figure 7 : Architecture neuronale et transport axonal des virus neurotropes

La dynéine est le moteur moléculaire responsable du transport rétrograde alors que la kinésine se déplace dans le sens opposé, antérograde. Les jonctions neuromusculaires (JNM) et les terminaisons neurosensorielles contiennent des molécules membranaires qui peuvent servir de récepteurs aux virus. Ainsi, certains adénovirus se lient au récepteur CAR à la JNM pour entrer dans le SNC. De même, le poliovirus se lie à CD155 et le virus de la rage (RABV) aux molécules NCAM et au récepteur nAChR. Au niveau des terminaisons nerveuses, les neurones possèdent la nectine 1, une protéine de surface reconnue par la glycoprotéine D des Herpesvirus. D'après Salinas *et al.*, 2010.

D'autres molécules présentes au niveau des terminaisons nerveuses sont reconnues par des virus. Par exemple, des protéines d'adhésion très conservées servent de récepteurs chez de nombreuses espèces. Ceci est illustré par le large spectre d'hôte des herpesvirus et du virus de la rage. De plus, des membres de la même famille de protéines peuvent servir de récepteurs à différents virus. CD155 sert de récepteur au poliovirus, tandis que la nectine-1 (aussi connu sous le terme de PVRL1) et la nectine-2 (PVRL2) sont des récepteurs pour les herpesvirus (Spear & Longnecker, 2003). L'interaction entre la glycoprotéine D des herpesvirus et la nectine-1 initie l'entrée du virus. Cela explique par ailleurs le tropisme préférentiel pour les neurones du ganglion spinal puisque la nectine-1 est présente au niveau des terminaisons neurosensorielles mais pas aux JNM (Richart *et al.*, 2003). De façon similaire, l'interaction du poliovirus avec CD155 au niveau des JNM pourrait être la première étape de la dissémination neuronale du virus (Racaniello 2006). Le récepteur au virus coxsackie et aux adénovirus (CAR, Coxsackievirus and Adenovirus Receptor) et NCAM sont présents à la JNM et servent de récepteurs d'entrée aux adénovirus (Salinas *et al.*, 2010) et au virus de la rage (Lafon, 2005), respectivement.

2.1.2.3 Recrutement de moteurs cellulaires et invasion du SNC

Les membres de la famille des herpesvirus, par exemple HSV-1 et le virus de la pseudorange (PRV), sont des exemples classiques de virus capables de recruter des moteurs moléculaires. Des études ont démontré le rôle crucial des microtubules dans le transport des herpesvirus (Sodeik *et al.*, 1997) et l'imagerie en temps réel de l'axone du calamar géant a permis de visualiser le transport axonal du virus (Bearer *et al.*, 2000). Plusieurs protéines d'HSV-1 et PRV peuvent interagir avec la dynéine ou la dynactine (Diefenbach *et al.*, 2008). Les capsides entrantes sont associées au complexe dynéine-dynactine, et leur transport est bloqué par la déstabilisation de ce complexe, provoquée par la surexpression de la dynamitine (Döhner *et al.*, 2002). Plusieurs protéines des herpesvirus sont associées avec des membres du complexe dynéine (Salinas *et al.*, 2010).

Virus à ARN	Sigle	Famille	Cibles principales dans le SNC
Virus de la pseudorage	PRV (SHV-1)	<i>Herpesviridae</i>	Neurones
Virus de la Forêt de Semliki	SFV	<i>Togaviridae</i>	Neurones
Virus de l'encéphalite équine vénézuélienne	VEEV	<i>Togaviridae</i>	Neurones
Virus de Sindbis	SINV	<i>Togaviridae</i>	Neurones
Virus du Nil occidental	WNV	<i>Flaviviridae</i>	Neurones
Virus de l'encéphalite japonaise	JEV	<i>Flaviviridae</i>	Neurones
Virus de la rage	RV	<i>Rhabdoviridae</i>	Neurones
Virus de la stomatite vésiculaire	VSV	<i>Rhabdoviridae</i>	Neurones
Virus de Borna	BDV	<i>Bornaviridae</i>	Neurones
Virus de la chorioméningite lymphocytaire	LCMV	<i>Arenaviridae</i>	Cellules méningées et neurones
Virus de Theiler	TMEV	<i>Picornaviridae</i>	Oligodendrocytes et neurones
Virus de l'hépatite murine	MHV	<i>Coronaviridae</i>	Oligodendrocytes et neurones

Table 3 : Virus utilisés comme modèle murin d'infection du SNC

La dynéine n'est pas le seul moteur recruté par les herpesvirus. La protéine du tégument d'HSV-1, uS11, peut se lier la kinésine *in vitro* (Diefenbach *et al.*, 2002). Alors que le transport rétrograde est une étape clé de l'invasion du SNC par les herpesvirus, le transport bidirectionnel a été observé dans les neurones sensoriels lors de l'entrée et de la sortie du virus (Smith *et al.*, 2004). Le transport rétrograde est prépondérant lors de l'entrée du virus, alors que le transport antérograde devient dominant lors de la sortie du virus, suggérant une régulation fine des moteurs moléculaires. Malgré le peu de connaissances à l'origine de ce phénomène, cela pourrait être dû à la différence de composition de la capsidie entre ces deux phases (Salinas *et al.*, 2010).

2.1.2.4 Cellules cibles au sein du SNC

Certaines infections virales du SNC provoquent des méningites en ciblant les cellules des leptoméninges qui recouvrent le cerveau. Ces virus ne causent pas d'infections persistantes puisqu'ils infectent des cellules renouvelables facilement accessibles au système immunitaire. En revanche, les virus qui infectent les neurones, bien que plus rares, induisent potentiellement des maladies fatales. Tous les neurones n'ont pas la même susceptibilité à l'infection, qui dépend du tropisme du virus considéré, de la voie d'entrée dans le SNC et du mécanisme de dissémination. Enfin, certains virus ciblent les cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes et microglie) seules ou avec les neurones.

2.1.3 Modèle animaux d'infections virales du SNC

La plupart de nos connaissances sur la réponse immunitaire antivirale au sein du SNC ont été collectées grâce à l'étude de modèles murins d'infection.

Les neurones sont la cible principale de nombreux virus chez le rongeur, que ce soit JEV, le virus de Sindbis (SINV), WNV et BDV. Les études les plus détaillées à

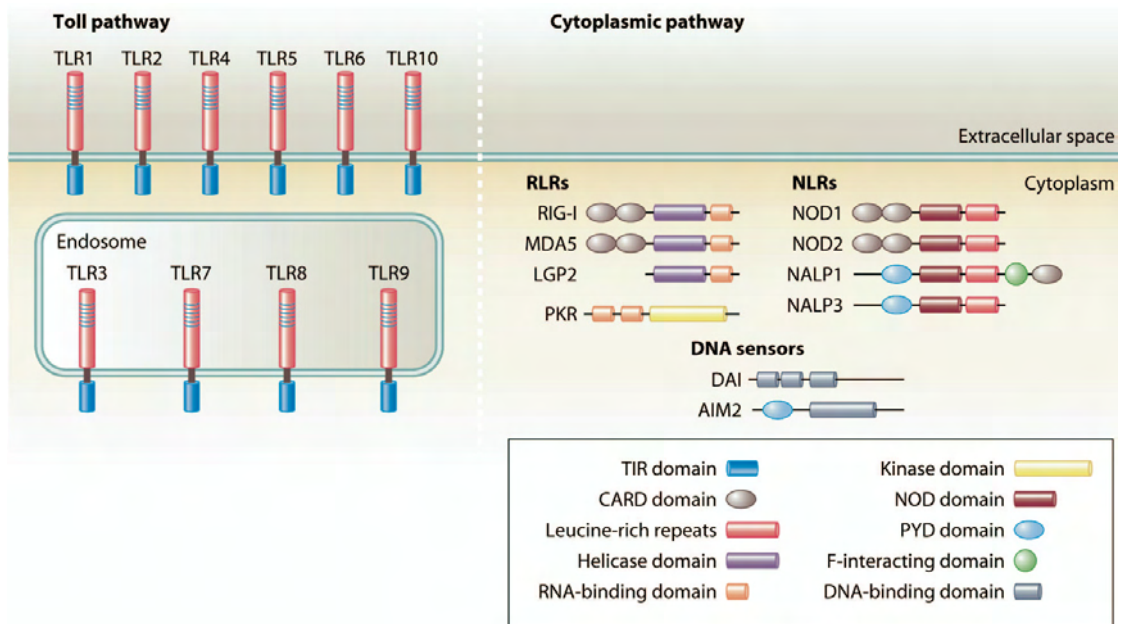


Figure 8 : PRR cellulaires

Les TLR sont liés à la membrane cellulaire ou endosomale et reconnaissent les PAMP par leur domaine LRR. Le signal est ensuite transduit grâce à leur domaine TIR intracellulaire.

Les RLR avec un domaine hélicase en C-terminal peuvent reconnaître l'ARN et transduire un signal grâce à leur domaine CARD. DAI et AIM2 sont des senseurs de l'ADN intracellulaire.

D'après Mogensen, 2009.

propos de la réponse immunitaire à une infection neuronale concernent le virus de la rage et les alphavirus transmis par les moustiques tels que SINV, le virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (VEEV) et le virus de la forêt de Semliki (SFV), qui peuvent tous causer une encéphalomyélite aiguë chez la souris. En ce qui concerne la réponse immunitaire à une infection des cellules gliales, TMEV (Brahic & Roussarie, 2009) et le virus de l'hépatite murine (MHV) (Griffin, 2003) ont été particulièrement étudiés. Un autre pathogène naturel de la souris, le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), a aussi été étudié de façon approfondie. LCMV, comme le virus de Borna, peut causer des maladies à médiation immune et une infection persistante du SNC (Table 3).

2.2 Réponse immunitaire innée antivirale

2.2.1 Détection des antigènes viraux dans le SNC

Les premières étapes de la réponse immunitaire innée sont déclenchées après la reconnaissance de motifs spécifiques conservés par les pathogènes ou PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) par des récepteurs spécifiques, les PRR (Pattern Recognition Receptors) (Figure 8).

Les acides nucléiques des virus stimulent la production d'IFN- α/β (Bergmann *et al.*, 2006) via des PRR membranaires, comme les TLR (Toll-Like Receptors) (Paul *et al.*, 2007), ou cytosoliques, comme les hélicases à ARN ou RLR (RIG-Like Receptors) (Figure 9) (Bowie & Haga, 2005).

La microglie et les astrocytes sont les deux types cellulaires qui expriment principalement des TLRs dans le SNC et donc capables d'y initier une réponse immunitaire innée contre des virus neurotropes (Pichlmair & Reis e Sousa, 2007). Toutefois, les neurones auraient aussi potentiellement la capacité d'induire une réponse immunitaire innée puisqu'ils expriment certains TLR, comme TLR3, et les RLR (Bieback *et al.*, 2002; Rassa *et al.*, 2002; Lafon *et al.*, 2006).

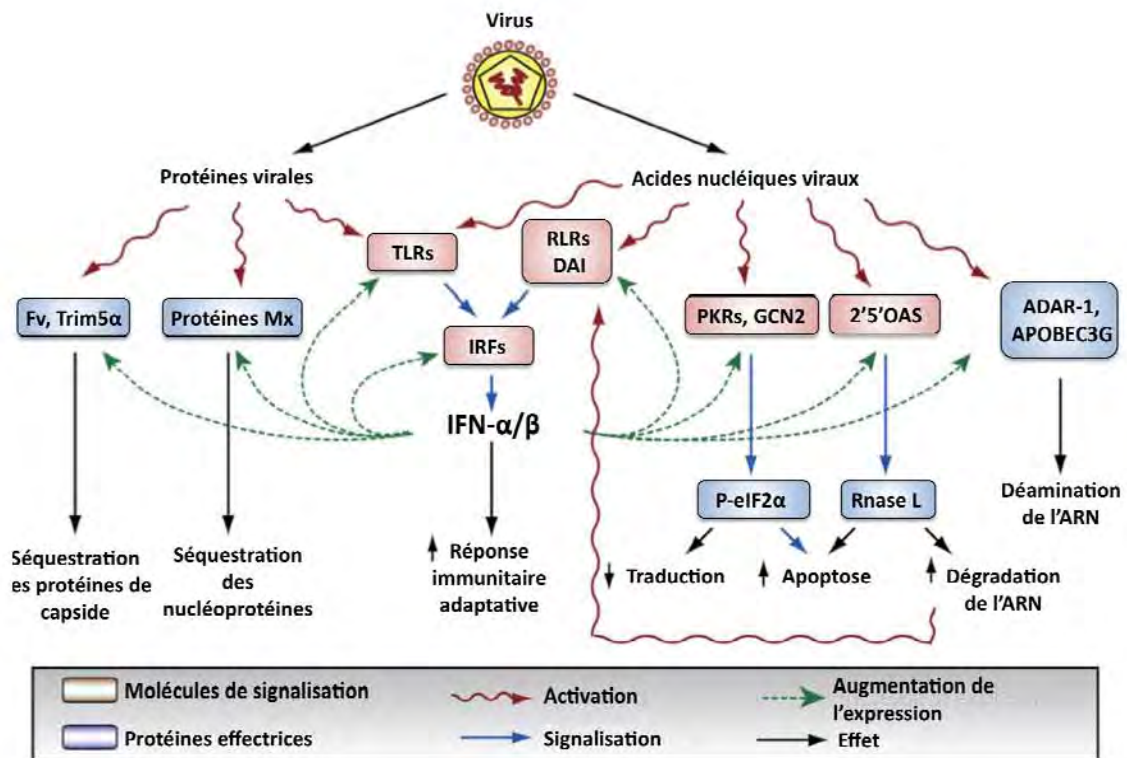


Figure 9: Différentes voies de reconnaissance virale par le système immunitaire innée

Les réponses immunitaires innées aux infections virales se focalisent sur les PAMP viraux, c'est-à-dire les protéines virales ou les acides nucléiques viraux.

Les acides nucléiques sont reconnus par PKR, GCN2 et d'autres kinases qui phosphorylent eIF2 α , entraînant la diminution de la traduction. De plus, l'ARN viral stimule OAS qui active la RNase L, entraînant la dégradation de l'ARN. Ces deux voies de reconnaissance de l'ARN viral peuvent induire l'apoptose. Enfin, l'ARN viral active les désaminases ADAR1 et APOBEC3 qui provoquent des mutations dans le génome viral.

Les protéines virales sont ciblées par des facteurs de restriction cytoplasmiques comme Fv (chez la souris), TRIM5 α (chez l'homme) ou les protéines Mx. Ces protéines virales avec les acides nucléiques viraux activent les TLR, RLR et DAI, initiant la cascade de signalisation qui induit l'activation des IRF et la transcription des gènes de l'IFN- α et - β . L'IFN- α/β effectue un rétrocontrôle positif en se liant à son récepteur IFNAR pour augmenter l'expression de protéines antivirales, amplifiant la résistance antivirale.

D'après Pichlmair & Reis e Sousa, 2007.

2.2.1.1 Détection virale dans le cytosol

Les PAMP viraux sont nombreux mais peuvent être regroupés en deux catégories : les acides nucléiques viraux et les protéines virales, majoritairement d'enveloppe. Par exemple, l'ARNdb remplit les critères pour être un PAMP: les molécules d'ARNdb sont absentes des cellules non infectées mais peuvent se former par appariement de 2 brins d'ARN complémentaires produits lors de la réplication des virus à ARN ou après transcription du génome des virus à ADN.

Les virus effectuent leur cycle infectieux dans le cytosol ou le traversent afin d'atteindre le noyau et s'y répliquer. Par conséquent, la cellule possède des récepteurs et des voies de signalisation pour induire la production d'IFN- α/β en réponse à la présence d'un virus dans le cytosol. La signalisation par l'IFN- α/β active la transcription d'IFN- α et d'ISG (IFN-Stimulated Gene), provoquant une amplification autocrine et paracrine de la réponse immunitaire innée antivirale.

2.2.1.1.1 La protéine kinase dépendante de l'ARN ou PKR

La première molécule cytoplasmique qui a été décrite comme étant capable de détecter l'ARNdb et d'induire la production d'IFN- α/β est la protéine kinase PKR (Protein Kinase RNA-activated) (Jacobs & Langland, 1996). Les cellules n'ayant pas de PKR fonctionnelle produisent en effet une quantité plus faible d'IFN de type 1 quand elles sont traitées avec du poly I:C, un analogue synthétique de l'ARNdb (Pichlmair & Reis e Sousa, 2007). Cependant, bien que la PKR puisse induire l'activation de NF- κ B, sa capacité à activer les facteurs régulateurs de l'IFN (IFN Regulatory Factors) IRF-3 et IRF-7, les facteurs de transcription critiques pour l'induction de la réponse IFN de type 1, n'a pas été formellement démontrée. Le rôle important de la PKR a récemment émergé, notamment dans la régulation de la stabilité de l'ARNm de l'IFN de type 1, en réponse à certains virus (Schulz *et al.*, 2010). Enfin, la transcription du gène codant la PKR est également activée par l'IFN- α/β , ce qui en fait donc un ISG.

2.2.1.1.2 Les hélicases à ARN cytosoliques ou RLR (RIG-Like Receptors)

RIG-I (Retinoic acid Inducible Gene) a été identifiée comme une hélicase cytoplasmique qui peut induire, via IRF3 et IRF7, la production d'IFN- α/β (Kumar *et al.*, 1994). RIG-I est une protéine cytosolique qui possède un site de liaison à l'ARN. Il a été récemment montré que son domaine en C-terminal agit comme un répresseur interne d'activation (Saito *et al.*, 2007).

Deux autres protéines apparentées à RIG-I ont été identifiées: MDA5 et LGP-2 (Saito *et al.*, 2007). Elles forment la famille des RLR (RIG-I Like Receptors). MDA5 possède un domaine de liaison à l'ARN similaire à celui de RIG-I, mais pas de domaine répresseur à son extrémité C-terminale et induit donc la production d'IFN de type 1 suite à sa surexpression (Creagh & O'Neill, 2006). En revanche, LGP-2 bloque l'induction d'IFN- α/β (Saito *et al.*, 2007) et est donc considéré comme un régulateur négatif des deux autres hélicases.

Etant donné que RIG-I et MDA5 lient tous les deux le poly I:C et utilisent une voie de signalisation commune, il était supposé que ces deux PRR jouaient un rôle redondant dans la reconnaissance virale. La génération de souris déficientes pour MDA5 ou RIG-I a démontré la spécificité remarquable des deux hélicases (Kato *et al.*, 2006). Les cellules déficientes pour RIG-I se distinguent par une réponse IFN- α/β très diminuée en réponse à l'infection par le virus de la grippe, le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), JEV et le virus de Sendai (Pichlmair & Reis e Sousa, 2007). En revanche, les cellules déficientes pour MDA5 ne répondent plus aux picornavirus, tels que le virus de l'encephalomyocardite (EMCV) et TEMV. Il est intéressant de noter que la réponse à l'ARNdb est différemment affectée entre les deux hélicases : elle est complètement abrogée chez les cellules déficientes pour MDA5 alors que les cellules déficientes pour RIG-I ne répondent qu'aux ARNdb générés par appariement d'ARNsb transcrits (Gitlin *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2006). RIG-I et MDA5 reconnaissent donc des motifs différents, spécifiques de certaines familles de virus à ARN. Toutefois, cette distinction n'est pas absolue et certains virus pourraient être reconnus par les deux hélicases.

RIG-I peut lier le poly I:C mais n'est pas activé, indiquant que la fixation d'ARN aux RLR n'est pas suffisante pour induire une réponse immunitaire innée. Le motif déterminant pour l'activation de RIG-I a récemment été identifié comme étant la présence de triphosphate à l'extrémité 5' des molécules d'ARN (Kato *et al.*, 2006). Cela explique en partie la spécificité de RIG-I pour les virus. En effet, les génomes à ARN de virus tels que celui de la grippe, de la rage ou VSV sont composés d'ARNsb possédant une extrémité 5' triphosphate libre et peuvent donc se lier à RIG-I et induire son activation (Pichlmair *et al.*, 2006). Par ailleurs, cette restriction explique aussi pourquoi RIG-I n'induit aucune réponse à l'infection par des picornavirus, dont l'extrémité 5' du génome est liée de façon covalente à une protéine virale (Pichlmair *et al.*, 2006).

Il est important de noter que nous ne savons toujours pas quels ARN viraux sont effectivement détectés par RIG-I durant une infection. En effet, s'il a bien été démontré expérimentalement que l'ARN génomique du virus de la grippe peut induire l'activation de RIG-I, il est difficile d'envisager comment cela pourrait être le cas lors d'une infection naturelle, quand le génome est recouvert par la nucléoprotéine virale et la polymérase liée à l'extrémité 5' (Racaniello, 2001). De plus, la réplication de ce virus se déroule dans le noyau, où la surveillance par RIG-I n'a pas lieu. Par conséquent, la détection par RIG-I doit se faire au moyen d'un ARN intermédiaire qui possède une extrémité 5' triphosphate et qui est présent dans le cytoplasme au cours de la réplication. En accord avec cette notion, durant l'infection par le virus de la rougeole, RIG-I est activé par des transcrits générés précocement lors du cycle de réplication viral (Lamb & Krug, 2001). En revanche, l'agoniste pour MDA5 reste inconnu à ce jour. Les picornavirus produisent une quantité importante d'ARNdb durant l'infection et MDA5 pourrait donc être un senseur de ces ARNdb.

Le rôle du troisième membre de la famille des RLR reste obscur. De façon cohérente avec un rôle inhibiteur, les cellules déficientes pour LGP-2 ont une capacité de production d'IFN de type 1 augmentée en réponse au traitement par le poly I:C ou à l'infection par VSV. Toutefois, la production d'IFN- β après infection par EMCV est également réduite dans ce cas. LGP-2 pourrait donc jouer à la fois un rôle activateur et inhibiteur aux réponses initiées par les deux autres hélicases.

2.2.1.1.3 La protéine activatrice des IRF dépendante de l'ADN ou DAI

Si l'ARN a été le centre de beaucoup d'attention, ce n'est pas le seul acide nucléique capable d'induire la production d'IFN- α/β . Ce n'est que récemment qu'il a été découvert que l'introduction d'une forme hélicoïdale d'ADNdb dans le cytoplasme entraînait la production d'IFN de type 1 (Venkataraman *et al.* 2007). Un candidat possible comme senseur de l'ADNdb cytosolique est la protéine DAI (DNA-dependent Activator of IRF) (Stetson & Medzhitov 2006). La surexpression de DAI augmente en effet la réponse IFN consécutive à la transfection d'ADN, alors qu'une déficience pour DAI la diminue. Cette voie de détection est sans doute impliquée dans la reconnaissance des virus à ADN et des bactéries qui accèdent au cytoplasme.

2.2.1.1.4 Les inflammasomes

Les inflammasomes sont des plateformes moléculaires activées suite à une infection ou un stress cellulaire, induisant l'activation de la caspase 1 et entraînant une cascade proinflammatoire. La plupart des descriptions des inflammasomes l'ont été dans des cellules myéloïdes comme les macrophages ou les cellules dendritiques. Cependant, des cellules non-myéloïdes peuvent également activer les inflammasomes.

Suite à son activation, l'inflammasome lie la procaspase 1, soit de façon homotypique au moyen de son domaine CARD (Caspase Recruitment Domain) ou via la protéine adaptatrice ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD) qui contient un domaine CARD. Le regroupement de plusieurs procaspases 1 entraîne leur autoclivage. La caspase 1 s'assemble en suite sous sa forme active, c'est-à-dire en dimère. Ainsi activée, elle effectue diverses fonctions en réponse au signal inflammatoire initial. Cela inclut le clivage protéolytique de la proIL-1 β en IL-1 β et de la proIL-18 en IL-18 afin d'induire la sécrétion d'IFN- γ , l'activation des cellules NK (Gu *et al.*, 1997), le clivage et l'inactivation de l'IL-33 (Cayrol *et al.*, 2009), la fragmentation de l'ADN et la formation de pore cellulaire (Fink *et al.*, 2006), l'inhibition d'enzymes glycolytiques (Shao *et al.*, 2007), l'activation de la biosynthèse

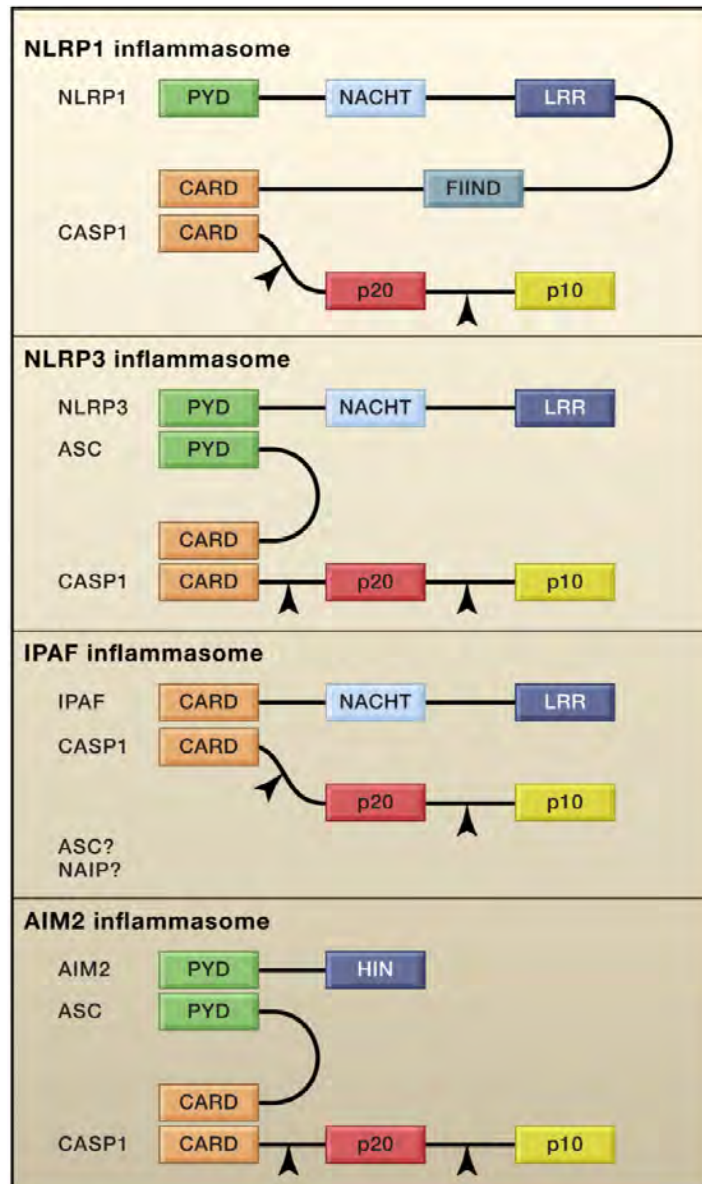


Figure 10 : Représentation des inflammasomes

La fixation de la procaspase 1 par son domaine CARD et son autoclivage aux sites indiqués par les flèches entraînent la formation de la forme activée, qui est un tétramère des deux parties clivées, p10 et p20.

LRR : domaine Leucine-Rich Repeat, PYD : domaine pyridine, NACHT : domaine d'oligomérisation.

D'après Schroder & Tschopp, 2010.

de lipides (Gurcel *et al.*, 2006) et la sécrétion de médiateurs de réparation tissulaire comme l'IL-1 α (Keller *et al.*, 2008).

De manière générale, un inflammasome est constitué de la caspase 1 (et de son substrat, la proIL-1 β), d'une protéine qui fait office de senseur et éventuellement d'une protéine adaptatrice (Martinon *et al.*, 2002). A ce jour, quatre senseurs différents ont été identifiés comme capables d'induire l'assemblage d'un inflammasome suite à des stimuli distincts : NLRP1, NLRP3, IPAF (ou NLRC4) et AIM2 (Figure 10) (Schroder & Tschopp, 2010).

L'inflammasome NLRP3

L'inflammasome NLRP3 est celui qui est le mieux caractérisé à ce jour. Il est constitué de NLRP3, de la protéine adaptatrice ASC, de la caspase 1 et de la proIL-1 β . NLRP3 est activée suite à l'exposition à des pathogènes ainsi que par certains PAMP, DAMP et agents environnementaux. Parmi les pathogènes susceptibles d'activer l'inflammasome NLRP3, on peut citer des mycètes (*Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*), des bactéries (*Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*) et des virus comme le virus de Sendai, les adénovirus et le virus de la grippe. Un certain nombre de molécules originaire du soi, signaux de dommages cellulaires, sont susceptibles d'activer l'inflammasome NLRP3. On peut citer l'ATP extracellulaire et l'acide hyaluronique libérés par les cellules en nécrose. L'inflammasome NLRP3 peut aussi détecter des stress métaboliques comme l'hyperglycémie ou les cristaux d'acide urique qui se forment en conditions d'hyperuricémique comme dans la goutte. Enfin, l'inflammasome NLRP3 peut provoquer une inflammation en réponse à des irritants environnementaux comme l'amiante et les rayons UVB (Schroder & Tschopp, 2010).

Suite à l'activation de NLRP3, son oligomérisation entraîne le regroupement des domaines pyrines ou PYD et leur interaction homotypique avec la protéine adaptatrice ASC, dont le domaine CARD recrute la procaspase 1. Le regroupement de la procaspase 1 permet son autoclivage et son activation, qui clivent ensuite les proformes des cytokines (comme la proIL-1 β) afin de générer des molécules actives.

L'inflammasome NLRP1

L'inflammasome NLRP1 a été le premier décrit. L'inflammasome NLRP1 est vraisemblablement activé par la toxine létale de *Bacillus anthracis* et le composant de la paroi bactérienne MDP (Muramyl DiPeptide). Contrairement à NLRP3, NLRP1 contient un domaine CARD permettant l'interaction directe avec la procaspase1, ASC n'étant de ce fait pas nécessaire à l'inflammasome NLRP1, bien que son intégration en augmente l'activité (Faustin *et al.*, 2007). De plus, NLRP1 interagit également avec la caspase 5, qui pourrait contribuer au traitement de l'IL-1 β .

L'inflammasome IPAF (ou NLRC4)

L'inflammasome IPAF est activé par les bactéries gram négatives possédant les systèmes de sécrétions de type III ou IV, comme *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Legionella pneumophila*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Comme IPAF contient un domaine CARD, il peut interagir directement avec la procaspase 1 (Poyet *et al.*, 2001). En revanche, de façon similaire à l'inflammasome NLRP1, l'activité est maximale en présence d'ASC. L'activation de l'inflammasome IPAF dépend des facteurs de virulence injectés dans le cytosol par les systèmes de sécrétion bactériens de type III et IV.

L'inflammasome AIM2

Il a récemment été identifié un senseur cytosolique d'ADNdb, AIM2, qui induit la maturation de l'IL-1 β de façon dépendante de la caspase 1 (Hornung *et al.*, 2009). C'est la première identification d'un inflammasome formé par une protéine n'appartenant pas à la famille des NLR. L'oligomérisation ne semble pas être dépendante d'un domaine spécifique (comme NACHT chez les NLR) mais plutôt par la fixation à de multiples sites de liaison sur le ligand, la molécule d'ADNdb. L'inflammasome AIM2 est composé d'AIM2, de la protéine adaptatrice ASC et de la caspase 1. AIM2 contient un domaine PYD qui permet l'interaction homotypique avec ASC et le recrutement de procaspase 1 au complexe par le domaine CARD d'ASC (Figure 10). Comme pour les autres inflammasomes, suite à son activation la caspase 1 induit la maturation et la sécrétion de cytokines proinflammatoires

comme l'IL-1 β et l'IL-18. Le ligand d'AIM2 est l'ADNdb cytosolique, qu'il soit d'origine virale, bactérienne ou de l'hôte lui-même.

2.2.1.2 Détection virale dans les endosomes par les TLR

La plupart des virus utilisent les voies d'endocytose/exocytose cellulaires, que ce soit lors de leur entrée dans la cellule ou lors du bourgeonnement viral (Takaoka *et al.*, 2007). Par conséquent, certains TLR sont dédiés à la surveillance virale au niveau des endosomes. Les TLR endosomaux partagent la propriété d'être activables par les acides nucléiques et regroupent TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9. Leur expression est augmentée par l'IFN- α/β , comme c'est le cas pour les RLR et DAI, à la différence qu'ils ont une distribution cellulaire plus restreinte. TLR7 et TLR9 sont fortement exprimés par les DC et principalement par les DC plasmacytoïdes (chez l'homme mais pas chez la souris). Ils sont toutefois également exprimés par d'autres cellules hématopoïétiques, telles que les LB (Brandenburg & Zhuang, 2007). TLR3 est exprimé plus largement, notamment par des cellules non hématopoïétiques comme les neurones, mais montre une expression préférentielle chez les DC conventionnelles (Reis e Sousa, 2004). Il y a moins de données concernant TLR8 qui, chez la souris, pourrait ne pas être fonctionnel ou avoir un rôle non immunologique (Reis e Sousa, 2004).

La signalisation de tous les TLR passe par la cascade des MAPK et l'activation de NF κ B, induisant la transcription de multiples gènes de cytokines et chimiokines. Toutefois, les TLR endosomaux possèdent des voies de signalisation additionnelles et activent IRF1, IRF3 et IRF7, induisant l'expression d'IFN de type 1.

TLR9 permet de répondre à l'infection par des virus à ADN comme les adénovirus, HSV-1 et -2 ou MCMV. De façon similaire, TLR7 médie les réponses aux virus à ARNs comme le virus de la grippe, VSV et le virus de Sendai (Pichlmair & Reis e Sousa, 2007).

Bien que TLR3 appartienne à la famille des TLR endosomaux, il est aussi exprimé à la membrane plasmique de certaines cellules (Diebold *et al.* 2004). Il a été identifié à l'origine comme un senseur de l'ARNdb puisqu'il est capable de médier les réponses au poly I:C et à l'ARNdb viral (Matsumoto *et al.* 2002). Les souris déficientes en TLR3 sont d'ailleurs résistantes au choc septique induit par l'injection de poly I:C, en comparaison avec les souris sauvages (Matsumoto *et al.* 2002; Alexopoulou *et al.* 2001). Il a récemment été décrit la formation d'inclusions sphériques d'1 à 3µm de large dans la région périnucléaire de neurones infectés par le virus de la rage, composées de TLR3 et de constituants viraux (Ménager *et al.* 2009). Ces agrégats ont ensuite été identifiés comme étant les corps de Negri, déjà décrits lors de l'infection par la rage. Ceux-ci sont indétectables chez des souris déficientes pour TLR3 et associés à une résistance accrue et un titre viral plus faible dans le cerveau des souris infectées. Cette étude est l'illustration d'un mécanisme de survie d'un virus neurotrope en compartimentalisant la réplication virale à l'intérieur de la cellule après avoir détourné le fonctionnement de protéines neuronales, ici TLR3.

En résumé, il existe de nombreux points communs entre les voies cytoplasmique et endosomale pour la reconnaissance des virus. Ces deux voies détectent la présence d'acides nucléiques viraux, que ce soit l'ADN, l'ARNsb ou l'ARNdb, et stimulent la production d'IFN- α/β par des voies de signalisation parallèles. Cela suggère que le système immunitaire inné est centré sur l'acide nucléique viral comme un déterminant invariable de la présence d'un virus.

2.2.1.3 Détection virale à la surface cellulaire

En plus des TLR endosomaux, TLR2 et TLR4 jouent également un rôle dans la détection virale. Bien qu'ils soient exprimés à la surface cellulaire, ils peuvent être recrutés au cytosol par des ligands internalisés. La signalisation par TLR2 n'est pas couplée directement à la production d'IFN de type 1. En revanche, c'est le cas de TLR4 (Underhill *et al.* 1999). Il a été observé que TLR2 permet de répondre à des

composants de virus tels que celui de la rougeole, le virus de l'hépatite C (HCV), le cytomégalo virus murin (MCMV) et HSV, alors que TLR4 permet de répondre à RSV, aux rétrovirus et au virus coxsackie B (Pichlmair & Reis e Sousa, 2007). Cependant, la reconnaissance virale dépendante de TLR2 et TLR4 est souvent restreinte à quelques composants viraux. Ainsi, de nombreux exemples de reconnaissance virale par TLR2 et TLR4 impliquent des protéines virales de surface. Celles-ci mutent régulièrement afin d'échapper à la reconnaissance par les anticorps (Sato *et al.*, 2006). Il est donc difficile d'envisager qu'elles ne puissent pas le faire également pour échapper à la reconnaissance par les TLR.

Il est intéressant de remarquer que la capacité du virus de la rougeole d'activer TLR2 est contrôlée par un seul acide aminé de l'hémagglutinine virale. Celui-ci est conservé dans les souches sauvages, mais pas dans les souches vaccinales, suggérant que le virus sauvage cible activement TLR2 afin de se disséminer (Hangartner *et al.*, 2006). De façon analogue, l'analyse de l'infection par le virus des tumeurs mammaires murin (MMTV) chez des souris déficientes pour TLR4 a révélé que le virus cible TLR4 pour se répliquer dans les LB et supprimer la réponse T CD8 (Rassa *et al.* 2002). Ces exemples d'engagement des TLR par les virus révèlent donc une exploitation du système immunitaire plutôt qu'une reconnaissance innée des virus.

Il a été démontré que TLR2 intervient dans la réponse cellulaire à l'infection par le CMV humain au niveau du syncytiotrophoblaste (Chaudhuri *et al.*, 2009). On peut penser qu'il interviendrait également dans la reconnaissance virale dans le SNC. Dans des cellules déficientes pour TLR2 ou CD14 (un corécepteur de TLR2 et TLR4), des virions de CMV inactivés par UV sont incapables d'activer NF- κ B et d'induire la production d'IL-6 et d'IL-8 (Rassa & Ross, 2003). TLR7 et TLR8 ont été décrits comme des composants essentiels de la reconnaissance des virus à ARN simple brin (ARNsb) et de l'ARNsb en général (Compton *et al.*, 2003). Les TLR3 et TLR9, qui reconnaissent l'ADN non-méthylé au niveau des motifs CpG, sont tous les 2 impliqués dans la défense contre l'infection par le CMV murin (Diebold *et al.*, 2004).

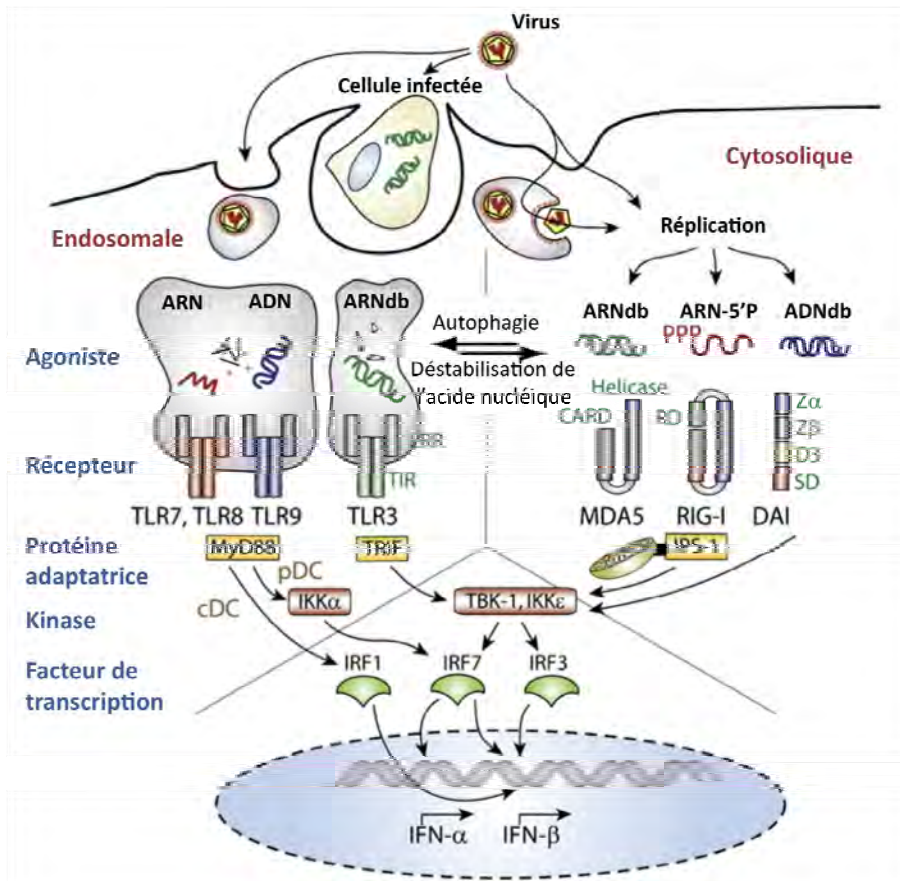


Figure 11 : Les voies couplant la reconnaissance virale à l'expression de l'IFN- α/β

Voie endosomale : la capture de virus ou de débris cellulaires infectés libère des acides nucléiques viraux dans les endosomes, où ils sont détectés par les TLR. Les TLR7, 8 et 9 active les facteurs de transcription IRF7 (dans les DC plasmacytoïdes) ou IRF1 (dans les DC conventionnelles) qui régule l'expression des gènes codant l'IFN- α et - β . **Voie cytosolique** : l'ARN viral est reconnu par MDA5 et RIG-I. La signalisation induit ensuite l'activation d'IRF3 et IRF7 et entraîne la transcription des gènes de l'IFN- α/β . Les récepteurs de l'ADN cytosolique comme DAI utilise d'autres protéines adaptatrices mais induit également l'activation d'IRF3 et IRF7 et la production d'IFN- α/β . Il y a probablement une communication importante entre les deux voies de reconnaissance. Les acides nucléiques peuvent s'échapper des endosomes pour activer les PRR cytosoliques et réciproquement, l'autophagie peut fournir des acides nucléiques viraux pour la reconnaissance endosomale.

LRR : Leucine-Rich Repeat, TIR : Toll/IL-1Receptor signaling domain, Helicase : RNA-binding domain, RD: Repressor Domain.

D'après Pichlmair & Reis e Sousa, 2007.

2.2.2 Production d'IFN- α/β

La première ligne de défense contre la propagation d'un virus vers et à l'intérieur du SNC est fournie par les IFN de type 1, α et β . La production rapide d'interférons de type 1 est importante pour la survie de l'hôte et dans la plupart des modèles d'infections du SNC, la susceptibilité à une infection létale est nettement augmentée chez des souris déficientes pour le récepteur des IFN- α/β (Tabeta *et al.*, 2004).

2.2.2.1 Cellules productrices d'IFN- α/β

Les DC plasmacytoïdes sont des acteurs principaux de la production d'IFN de type 1 *in vivo*, probablement parce qu'elles expriment constitutivement IRF7. Elles sont cependant absentes du parenchyme cérébral d'animaux sains.

Les astrocytes et la microglie sont capables de produire de l'IFN- α/β suite à une infection virale *in vitro* (Serafini *et al.*, 2000). De même, la production d'IFN- α/β par la microglie et les cellules épendymaires a été détectée *in vivo* dans le cerveau de souris infectées.

L'expression des IFN de type 1 par les neurones, bien que longtemps controversée, a été démontrée suite à l'infection par le virus de la rage (Delhaye *et al.* 2006), le TMEV ou le virus de La Crosse (Préhaud *et al.*, 2005). Toutefois, il apparaît qu'il y a une régulation fine des voies IFN dans les neurones puisque, bien que tous infectés, seule une minorité d'entre eux engage la transcription d'IFN- α/β (Delhaye *et al.*, 2006).

2.2.2.2 Réponse induite par l'IFN- α/β

L'expression du récepteur spécifique des IFN de type 1 étant ubiquitaire, toutes les cellules du SNC peuvent répondre à l'IFN- α/β (Figure 11). Toutefois, l'induction, la signalisation, l'activation des gènes cibles ainsi que le mode d'action des l'IFN- α/β est dépendant du type cellulaire et du virus (Delhaye *et al.*, 2006).

L'IFN- β , synthétisé à la fois par les neurones et les cellules gliales, est le principal IFN de type 1 produit dans le SNC et est requis pour l'induction de l'IFN- α *in vitro* (Pichlmair & Reis e Sousa, 2007; Paul *et al.*, 2007). La production préférentielle d'IFN- β plutôt que d'IFN- α dans le SNC est aussi neuroprotectrice puisque l'IFN- α a une neurotoxicité plus importante comparée à l'IFN- β (Erlandsson *et al.*, 1998). De plus, l'IFN- β pourrait également induire la sécrétion de facteurs neurotrophiques par les astrocytes (McLaurin *et al.*, 1995), ainsi que la production locale de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Boutros *et al.*, 2002). La production rapide et localisée d'IFN de type 1 après infection ralentit la dissémination virale et restreint la réplication virale avant l'induction de la réponse immunitaire adaptative antivirale.

La signalisation par les TLR et les RLR induit l'expression d'IFN- α/β et l'activation plus tardive de gènes induits par ces IFN (ISG, IFN Stimulated Genes). Ceux-ci agissent de concert pour amorcer des programmes de défense antivirale à différents niveaux, comme l'induction de gènes antiviraux, l'amplification de l'apprêtement antigénique, l'inhibition de la réplication virale et de sa transcription, ainsi que la régulation de l'activité lymphocytaire (Chabot & Yong, 2000). Les facteurs affectant directement la réplication virale sont :

- PKR, OAS, RNaseL, ISG54 et ISG56 qui modulent la traduction,
- Mx, qui inhibe la transcription virale,
- les désaminases à ARN, ADAR-1 et APOBEC3G, qui provoquent des mutations dans le génome viral (Borden, 2007).

La réactivité à l'IFN- α/β des cellules du SNC est signalée par l'induction de différents ISG, notamment ISG54 et ISG56, ainsi que Mx, IRF-7 et IRF-9 suite à différentes infections (Borden *et al.*, 2007).

Toutefois, la plupart des virus ont évolué afin de pouvoir persister dans les neurones grâce à des mécanismes d'évasion de la réponse immune, que ce soit en contrariant, supprimant ou bloquant les protéines cibles et adaptatrices participant à la réponse antivirale via la production d'IFN- α/β (Delhaye *et al.*, 2006; Ireland, 2008b; Wachter *et al.*, 2007; Ousman *et al.*, 2005).

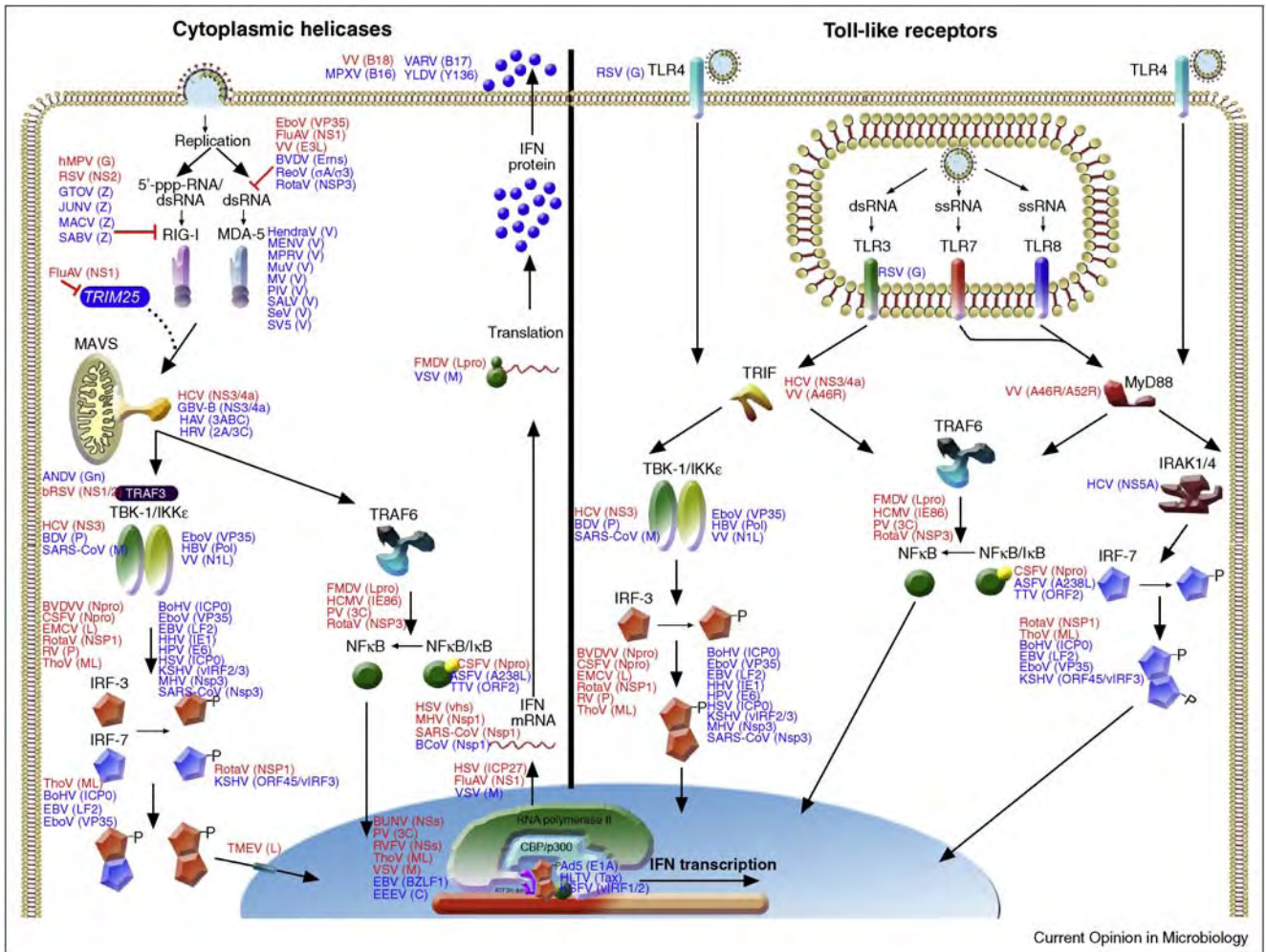


Figure 12 : Protéines virales antagonistes de l'induction d'IFN de type 1

Les virus ainsi que leurs protéines antagonistes sont indiqués aux étapes de la voie de signalisation de l'interféron qu'ils affectent. En rouge sont représentés les antagonistes dont la preuve de leur effet a été apportée au moyen d'un virus recombinant délété pour l'antagoniste en question. En bleu sont représentés les antagonistes dont la preuve a été apportée par surexpression et/ou infection avec le virus sauvage.

D'après Versteeg & García-Sastre, 2010.

2.2.2.3 Régulation de la réponse à l'IFN- α/β

Les protéines SOCS (Suppressors Of Cytokine Signaling) constituent une famille de protéines qui ont pour fonction de réguler l'activité des cytokines en réprimant leur voie de signalisation. Les protéines SOCS1 et SOCS3 inhibent la voie JAK-STAT qui est typiquement induite par les cytokines.

Dans la microglie, l'IFN- β induit l'expression de SOCS1, qui restreint donc l'activation de STAT1 et la transcription des gènes induits par l'IFN- β , formant une boucle de rétrocontrôle négatif.

Dans les astrocytes, l'activation des facteurs de transcription STAT1 et STAT3 par l'IFN- β induit l'expression de SOCS1 et SOCS3 (Qin *et al.*, 2006). SOCS1 et SOCS3 inhibent l'expression de plusieurs chimiokines normalement induites par l'IFN- β , contrôlant l'inflammation induite par les astrocytes.

2.2.2.4 Protéines virales antagonistes du système IFN de type I

Les stratégies virales allant à l'encontre de la réponse IFN de type I sont multiples et ciblent chacune des composantes du système IFN de type I (Figure 12 et 12bis). Par exemple, le TEMV possède des protéines, L et L*, qui n'interviennent pas dans la réplication du virus mais dont la fonction est d'interférer avec le système IFN de type I. La protéine L inhibe ainsi la transcription des gènes codant les IFN- α/β , ainsi que d'autres cytokines et chimiokines impliquées dans la réponse immunitaire antivirale (van Pesch *et al.*, 2001). La mutation de la protéine perturbe son activité inhibitrice, réduisant la virulence du virus et empêchant sa persistance (van Pesch *et al.*, 2001). La protéine L* quant à elle, inhibe l'activité de la RNaseL dont le rôle est de dégrader les ARN présents dans la cellule infectée. Tout comme la protéine L, la protéine L* est cruciale pour la persistance du TMEV.

Par ailleurs, il a été observé que la phosphoprotéine P du BDV peut inhiber l'expression cellulaire d'IFN- β dépendante de TBK-1, une protéine kinase régulatrice de IRF3. En effet, la protéine P serait phosphorylée par TBK-1, agissant comme un substrat leurre et prévenant ainsi l'activation des protéines cibles de TBK-1 qui ne

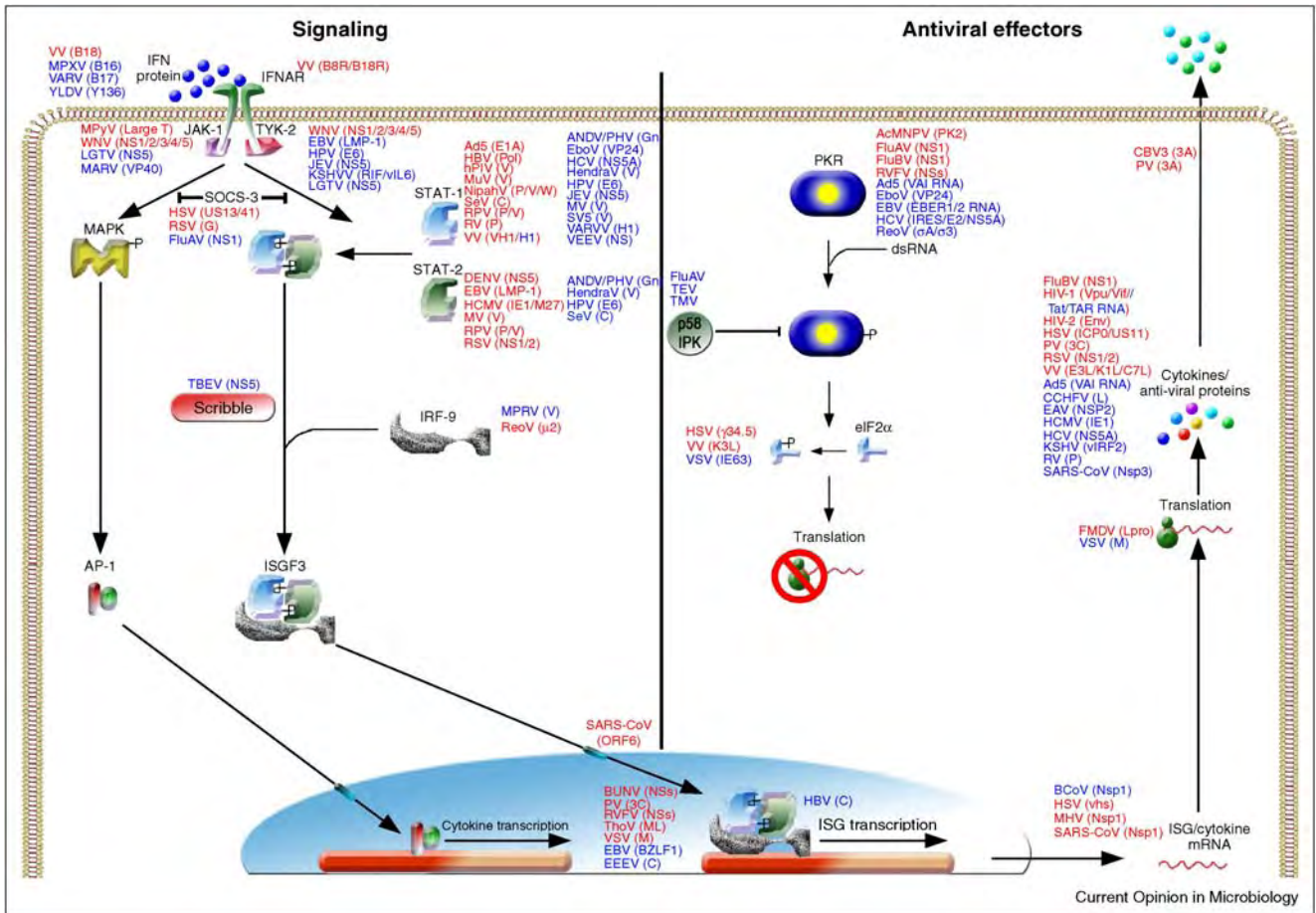


Figure 12bis : Protéines virales antagonistes de la signalisation par l'IFN de type 1

Les virus ainsi que leurs protéines antagonistes sont indiqués aux étapes de la voie de signalisation de l'interféron qu'ils affectent. En rouge sont représentés les antagonistes dont la preuve de leur effet a été apportée au moyen d'un virus recombinant délété pour l'antagoniste en question. En bleu sont représentés les antagonistes dont la preuve a été apportée par surexpression et/ou infection avec le virus sauvage.

D'après Versteeg & García-Sastre, 2010.

peuvent alors induire l'expression d'IFN- β (Unterstab *et al.*, 2005).

2.3 Réponse immunitaire adaptative antivirale

Malgré son rôle crucial dans la reconnaissance virale et sa capacité à ralentir la dissémination virale, la réponse immunitaire innée est rarement suffisante pour contrôler les infections au sein du SNC.

2.3.1 Induction de la réponse immune adaptative

Une réaction immunitaire dirigée contre un Ag du SNC nécessite que plusieurs conditions soient remplies : l'activation en périphérie des LT au niveau des nœuds lymphatiques, puis l'infiltration du SNC, la réactivation et l'expansion clonale des LT spécifiques. Ces différentes étapes requièrent la modulation de l'environnement immunosuppresseur du parenchyme cérébral, la migration à travers la BHE et la formation d'une synapse immunologique suite à la reconnaissance de l'Ag spécifique.

2.3.1.1 Activation des effecteurs de l'immunité adaptative

Les infections naturelles du SNC en général initiées en périphérie. En effet, tous les virus neurotropes infectent via la périphérie, que ce soit par les tractus gastro-intestinal et respiratoire, la piqûre d'un moustique contaminé ou la morsure d'un animal infecté. De ce fait, l'induction d'une réponse immune antivirale a lieu en périphérie via la capture du virus ou de ses Ag par les DC, qui présenteront les Ag viraux au niveau du nœud lymphatique drainant. Ceci est également vrai pour les infections expérimentales car même en cas d'inoculation intracérébrale, il est presque inévitable de retrouver une fraction du virus injecté en périphérie. L'activation en périphérie des lymphocytes permet l'expression des molécules d'adhésion et des récepteurs de chimiokines, qui facilitent l'entrée des lymphocytes circulant dans le SNC. Il est important de noter que si l'entrée des LT dans le SNC est

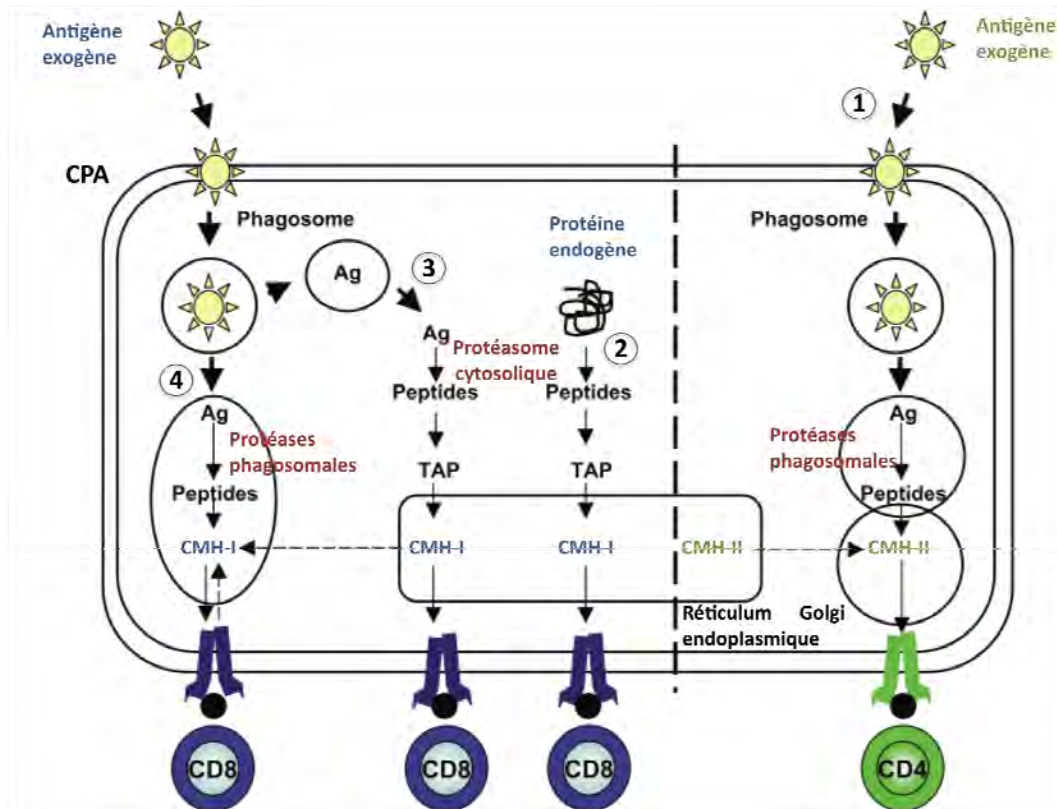


Figure 13 : Mécanismes moléculaire d'apprêtement et de présentation des antigènes

- ① Les CPA présentent les antigènes (Ag) exogènes à leur surface associés aux molécules du CMH-II pour la reconnaissance par les LT CD4.
- ② Les protéines synthétisées dans la cellule, qu'il soit originaire du soi ou d'un virus, sont dégradées en peptides et apprêtés sur des molécules du CMH-I néo-synthétisées. Ces complexes CMH-I/peptide sont alors transportés par l'appareil de Golgi à la surface de la cellule pour être présentés aux LT CD8.
- ③ Les Ag exogènes internalisés sont dégradés par le protéasome en peptides. Les peptides s'associent ensuite aux molécules du CMH-I. Les complexes CMH-I/peptide sont alors transportés à la surface de la cellule.
- ④ Les Ag peuvent être dégradés par les protéases du phagosome. Les molécules du CMH-I sont alors recyclées de la membrane ou du RE au phagosome, où elles sont chargées en peptide et redélivrées à la surface de la cellule.

D'après Melzer *et al.*, 2009.

indépendante de l'Ag, leur rétention et leur fonction antivirale est au contraire dépendante de la reconnaissance spécifique de l'Ag associé au CMH.

2.3.1.1.1 Drainage des antigènes du SNC

Il est généralement accepté que l'activation par l'Ag des LT et LB naïfs a lieu dans des organes lymphoïdes secondaires, c'est-à-dire ici les nœuds lymphatiques cervicaux (NLC), par des CPA professionnelles. Deux voies de transport des Ag du SNC aux NLC ont été suggérées : les Ag du SNC peuvent être drainés passivement par le LCR, qui est relié aux vaisseaux lymphatiques ou peuvent atteindre les NLC après capture par des CPA résidant dans l'espace périvasculaire et qui peuvent migrer activement (Galea *et al.*, 2007).

2.3.1.1.2 Apprêtement de l'antigène et présentation croisée

Les CPA présentent plutôt les Ag exogènes associés au CMH-II pour la reconnaissance par les LT CD4 (Figure 13). Après endocytose par différents mécanismes, les Ag exogènes sont dégradés dans le phagosome qui fusionne ensuite avec les vésicules de l'appareil de Golgi contenant les molécules du CMH-II matures. Ces molécules du CMH-II sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE), où elles sont associées avec le peptide de la chaîne invariante (Ii) qui prévient ainsi toute association du CMH-II aux Ag endogènes. Les complexes CMH-II/Ii se déplacent ensuite à l'appareil de Golgi, où le peptide de la chaîne invariante est clivé, ne laissant qu'une partie du peptide associée au CMH-II, appelée CLIP (Class II-associated Invariant chain Peptide). CLIP est ensuite échangé pour le peptide antigénique, formant les complexes CMH-II/Ag. Ces complexes sont finalement transportés à la surface de la cellule pour être présentés aux LT CD4.

En revanche, les protéines synthétisées dans la cellule, originaires du soi ou d'un pathogène, sont dégradées en peptides dans le cytosol par le protéasome. Ces

peptides cytosoliques sont ensuite acheminés par des transporteurs spécifiques appelés TAP (Transporter-associated with Antigen Presentation) au RE, où ils sont apprêtés sur des molécules du CMH-I néo-synthétisées. Ces complexes CMH-I/peptide sont ensuite transportés par l'appareil de Golgi à la surface cellulaire pour être présentés aux LT CD8. Les CPA peuvent également capturer les Ag exogènes solubles ou liés à la membrane cellulaire, les apprêter et les présenter associés au CMH-I aux LT CD8 naïfs ; un phénomène appelé présentation croisée (Ackerman & Cresswell, 2004). Certaines CPA, comme les DC et la microglie, sont capables de présentation croisée d'Ag exogènes par le CMH-I pour activer les LT CD8. Les Ag exogènes internalisés sont exportés du phagosome au cytosol, où ils sont dégradés par le protéasome. Les peptides sont ensuite transférés du cytosol au RE par les transporteurs TAP, où ils s'associent aux molécules du CMH-I. Les complexes CMH-I/peptide sont alors transportés à la surface de la cellule. De façon alternative, les Ag peuvent être dégradés par les protéases du phagosome. Les molécules du CMH-I sont alors recyclées de la membrane ou du RE au phagosome, où elles sont chargées en peptide et redélivrées à la surface de la cellule.

Cependant, la présentation croisée des Ag du SNC induit généralement une tolérance des LT CD8 (Kurts *et al.*, 1998), sauf en présence de LT CD4 spécifiques du même Ag qui favorisent l'activation et l'expansion des LT CD8 (Kurts *et al.*, 1997). De plus, la présentation croisée d'Ag solubles est plus importante quand la destruction tissulaire par les CTL est considérable (Kurts *et al.*, 1998).

En effet, l'injection intracérébrale de cellules déficientes pour le CMH-I exprimant un Ag membranaire induit la phagocytose par les DC, la présentation croisée au niveau des NLC et la migration au SNC de LT CD8 spécifiques de l'Ag (Walter & Albert, 2007). La présentation croisée dépend en fait du rôle auxiliaire des LT CD4, au moyen de la signalisation via CD40 à la CPA (Bennett *et al.*, 1998). Ainsi, il a été démontré l'importance de ce phénomène en implantant des cellules de gliome déficientes pour le CMH-I, incapables donc de présentation directe des Ag tumoraux. L'accumulation de LT CD8 fonctionnels spécifiques de la tumeur, ainsi que leur

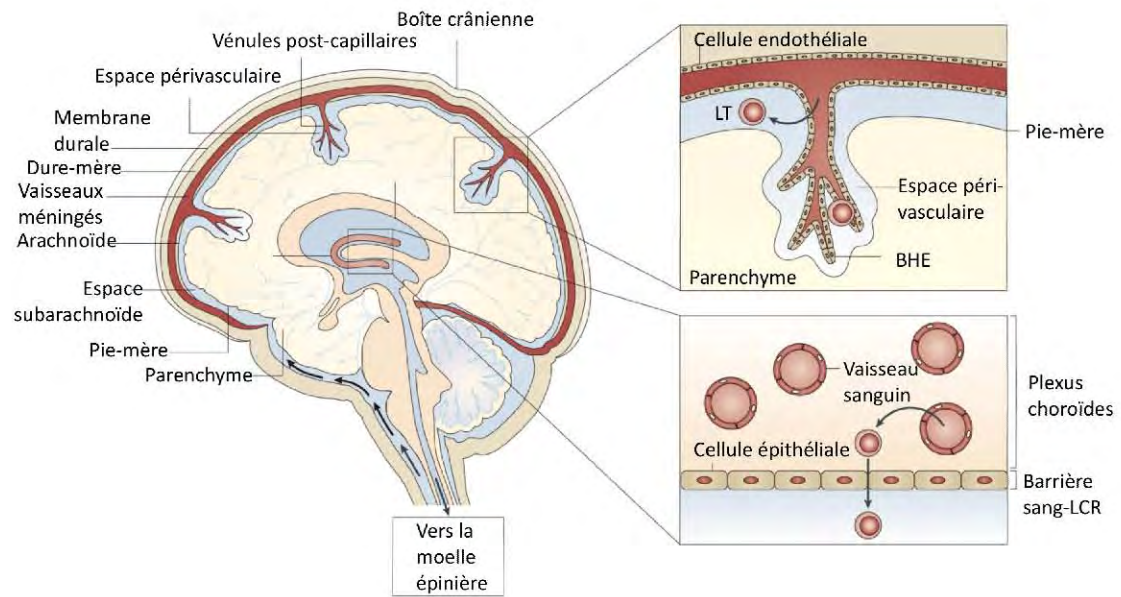


Figure 14 : Organisation anatomique du cerveau montrant les voies possibles d'entrée des lymphocytes T activés

Les LT activés peuvent pénétrer dans l'espace subarachnoïde en migrant des vaisseaux sanguins au stroma des plexus choroïdes, puis en traversant la barrière sang-LCR. De plus, les LT activés peuvent traverser la BHE au niveau des vénules postcapillaires qui s'enfoncent dans le parenchyme cérébral. Les LT traversant la BHE pénètrent alors dans l'espace périvasculaire, la région située entre la membrane basale connectée aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et la glia limitans (composée de pieds astrocytaires et la microglie).

D'après Goverman, 2009.

réretention dans le SNC, implique par conséquent une présentation croisée des Ag tumoraux (Calzascia *et al.*, 2003; Calzascia *et al.*, 2005). Cette voie de présentation/activation nécessite un événement lésionnel initial dans le SNC, tel qu'une infection, une croissance tumorale, une ischémie, un traumatisme ou une dégénérescence "spontanée" afin de relarguer des Ag du SNC.

2.3.1.2 Infiltration du SNC par les lymphocytes T

L'entrée des LT circulants dans le SNC est normalement bloquée par l'existence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, ainsi que leur faible capacité d'endocytose et la faible expression de molécules d'adhésion (Harling-Berg *et al.*, 1999). Néanmoins, plusieurs études ont montré que les LT activés peuvent traverser la BHE et effectuer une surveillance immunitaire, comme c'est le cas pour tous les tissus (Irani & Griffin, 1996) (Figure 14). L'infiltration de cellules inflammatoires mononucléées dans le SNC a lieu généralement une semaine après l'infection. Les cellules s'accumulent d'abord dans l'espace périvasculaire et infiltrent ensuite le parenchyme cérébral au niveau des régions infectées. Toutes les composantes cellulaires de la réponse inflammatoire sont détectées dans ces infiltrats : les cellules NK (Natural Killer), les LT CD4 et CD8, les LB et les monocytes/macrophages (Ransohoff *et al.*, 2003). Les cellules NK sont les premières cellules détectées, suivies par les LT CD4 et CD8, puis les LB et les monocytes/macrophages (Irani & Griffin, 1991). De plus, des DC sont détectées dans le SNC lors d'une inflammation, pénétrant le SNC à partir de la circulation ou se développant à partir d'une sous-population de microglie activée. Le pic de l'inflammation, en terme de cellules infiltrantes, a lieu entre une à deux semaines après l'infection. Ces cellules sont ensuite progressivement éliminées, sauf si le virus persiste.

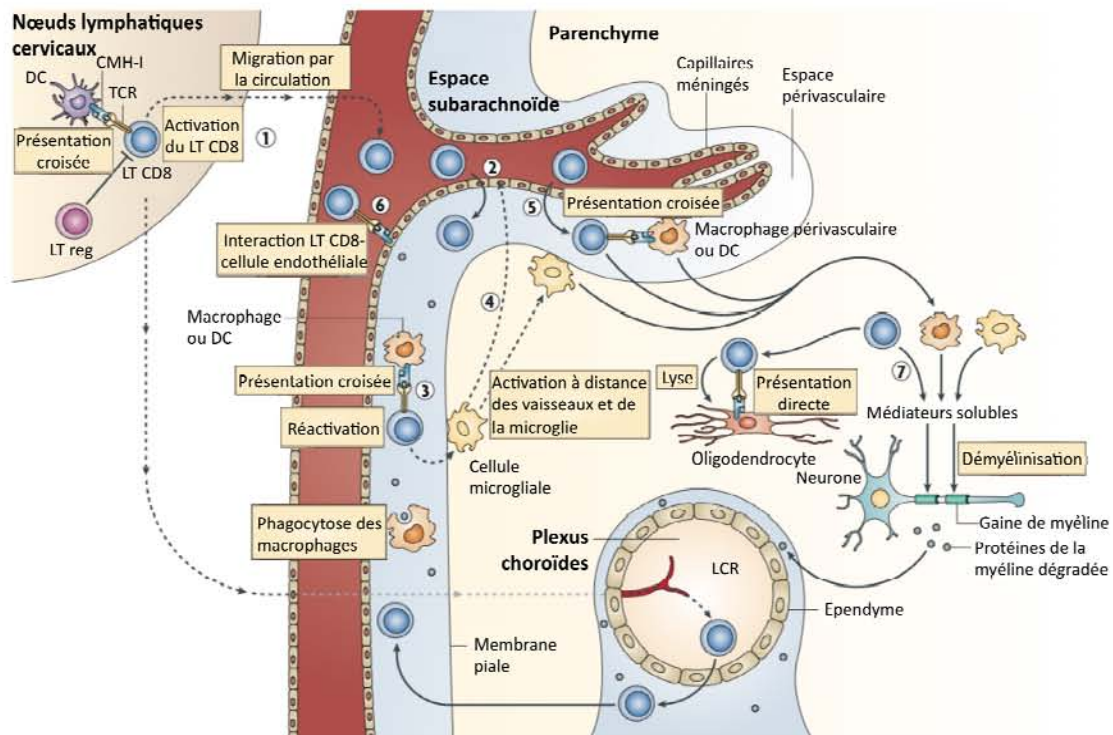


Figure 15 : Différentes étapes de la réponse T CD8 au SNC

Les LT CD8 sont activés par présentation croisée des DC aux nœuds lymphatiques cervicaux. ① Les CPA résidentes du SNC peuvent capturer des Ag du SNC et migrer aux nœuds lymphatiques cervicaux. De façon alternative, les Ag solubles du SNC peuvent être drainés aux nœuds lymphatiques cervicaux et y être phagocytés par les CPA présentes. ② Les LT CD8 activés pénètrent dans l'espace subarachnoïde en traversant la barrière sang-LCR au niveau des plexus choroïdes ou des vaisseaux méningés. ③ Les LT CD8 sont ensuite réactivés par les macrophages, et les DC présentes dans l'espace subarachnoïde par présentation croisée. ④ Les lymphocytes réactivés activent la microglie à proximité de la membrane piaie, induisant leur activation ainsi que celle des capillaires sanguins. ⑤ Les LT CD8 activés traversent la BHE et entrent dans l'espace périvasculaire où ils sont réactivés par les macrophages périvasculaires et les DC présentes. ⑥ Les cellules endothéliales peuvent également directement présenter des épitopes si elles ont accès aux Ag du SNC. ⑦ Les LT CD8 pénètrent ensuite dans le parenchyme cérébral où, avec les macrophages et la microglie activés, ils sécrètent des médiateurs solubles et peuvent exercer leur rôle cytolytique directement.

D'après Goverman, 2009.

2.3.1.2.1 Infiltration par les lymphocytes T CD4

Après activation par l'Ag dans les organes lymphoïdes, les LT CD4 peuvent atteindre le LCR par différentes voies d'accès : ils peuvent passer à travers l'endothélium fenestré des plexus choroïdes, migrer à travers le stroma jusqu'aux cellules épithéliales et passer dans le LCR à son site de formation. D'autre part, les LT CD4 peuvent passer par diapédèse à travers les vénules postcapillaires dans l'espace subarachnoïde et l'espace périvasculaire (les deux étant reliés), où ils sont susceptibles d'interagir avec des CPA (Ransohoff *et al.*, 2003). En effet, pour pénétrer le parenchyme cérébral, les LT CD4 doivent reconnaître leur Ag spécifique associé au CMH-II, présenté par une CPA. Suite à la réactivation, ils peuvent traverser la *glia limitans*, formée par les pieds astrocytaires au niveau périvasculaire. Cela implique la présence de l'Ag spécifique dans le LCR ou le parenchyme, afin qu'il y ait une réactivation possible des LT CD4, puis invasion du parenchyme cérébral. En effet, l'expression du CMH-II par les CPA périvasculaires est nécessaire et suffisante pour le développement d'une maladie neurologique induite par le transfert adoptif chez la souris de LT CD4 activés spécifiques d'Ag du SNC, démontrant que l'infiltration du SNC par les LT CD4 dépend de la reconnaissance antigénique (Greter *et al.*, 2005; Flügel *et al.*, 2001; Kawakami *et al.*, 2005).

2.3.1.2.1 Infiltration par les lymphocytes T CD8

Après transfert adoptif ou immunisation, les LT CD8 spécifiques d'un Ag cérébral peuvent pénétrer le SNC de manière similaire aux LT CD4 (Ford *et al.*, 2005; Huseby *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2001) (Figure 15). Leur relevance dans la pathogénicité d'autres modèles de neuroinflammation a été démontrée (Brisebois *et al.*, 2006; Ip *et al.*, 2006). Toutefois, les mécanismes d'entrée des LT CD8 au SNC n'ont été que récemment étudiés. Galea *et al.* ont démontré que suite à une injection intracérébrale d'Ag de l'hémagglutinine (HA) chez des souris transgéniques CL4 (qui possèdent des LT CD8 avec un TCR de forte avidité pour HA), seuls ces LT CD8 infiltrent le cerveau. Cette dépendance vis à vis de l'Ag de l'infiltration des LT

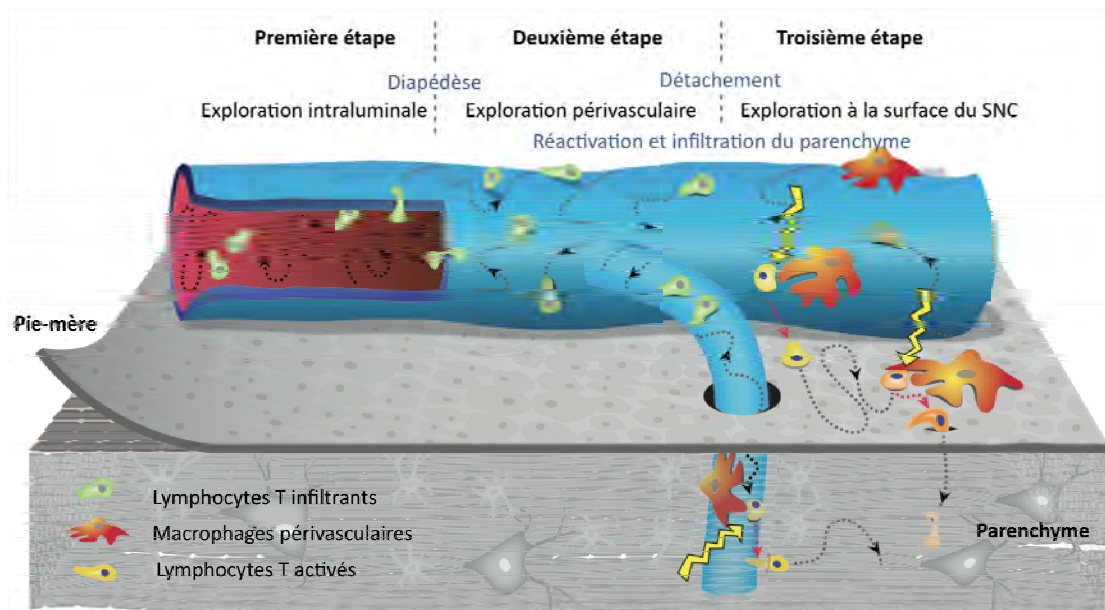


Figure 16: Différentes étapes de l'infiltration du SNC par les lymphocytes T

Les LT circulant activés en périphérie explorent tout d'abord la paroi intraluminaire des capillaires sanguins du SNC. Suite à l'interaction avec des molécules d'adhésion, les lymphocytes traversent l'épithélium et continuent leur exploration du côté extraluminal, où ils restent en opposition étroite avec les vaisseaux. Puis, suite à l'interaction avec un macrophage périvasculaire (ou péricyte) présentant leur Ag spécifique associé au CMH, ils se détachent du réseau vasculaire et envahissent le parenchyme cérébral.

D'après Bartholomäus *et al.*, 2009.

CD8 dans le SNC n'est pas due à la présentation périvasculaire par des CPA mais à l'expression du CMH-I par les cellules endothéliales cérébrales (Galea *et al.*, 2007). De façon remarquable, ces LT CD8 ne sont pas complètement activés, comme le révèle l'absence d'expression de molécules cytolytiques et de lésions tissulaires. En revanche, l'expression de ces molécules ainsi que des lésions axonales peuvent être induites par l'immunisation avec l'Ag HA ou le transfert de LT CD8 activés par l'Ag *in vitro*.

Ainsi, l'infiltration du SNC par les LT CD4 et CD8 après activation dans les NLC semble être un processus dépendant de l'Ag. Toutefois, le site de présentation antigénique semble différer pour les deux populations de LT. En revanche, les LT activés qui entrent dans le SNC n'y sont pas retenus en l'absence d'Ag et soit le quittent ou meurent *in situ*.

L'arrêt des LT circulants nécessite l'interaction avec des molécules d'adhésion (Figure 16). Par exemple, la migration transendothéliale des LT CD4 activés s'effectue notamment grâce à l'interaction entre PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand 1, un ligand de selectines), exprimé à la surface des LT activés, et la P-selectine, qui est faiblement exprimée par les cellules endothéliales du réseau cérébro-vasculaire sain (Marten *et al.*, 2000). En conditions inflammatoires, la production locale de chimiokines et l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales des capillaires amplifient encore l'extravasation des LT activés dans le SNC (Carrithers *et al.*, 2000). Ainsi, l'expression d'ICAM1 (InterCellular Adhesion Molecule 1 ou CD54) et de VCAM1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) par les cellules endothéliales des capillaires cérébraux est augmentée lors d'une infection virale. Dans le cas du modèle d'infection chez le rongeur avec le virus de Sindbis, des anticorps spécifiques de l'intégrine LFA1 (Leukocyte Function-associated Antigen 1), qui est un ligand d'ICAM1, bloquent l'entrée des lymphocytes au SNC durant la réponse inflammatoire aiguë (Alt *et al.*, 2002).

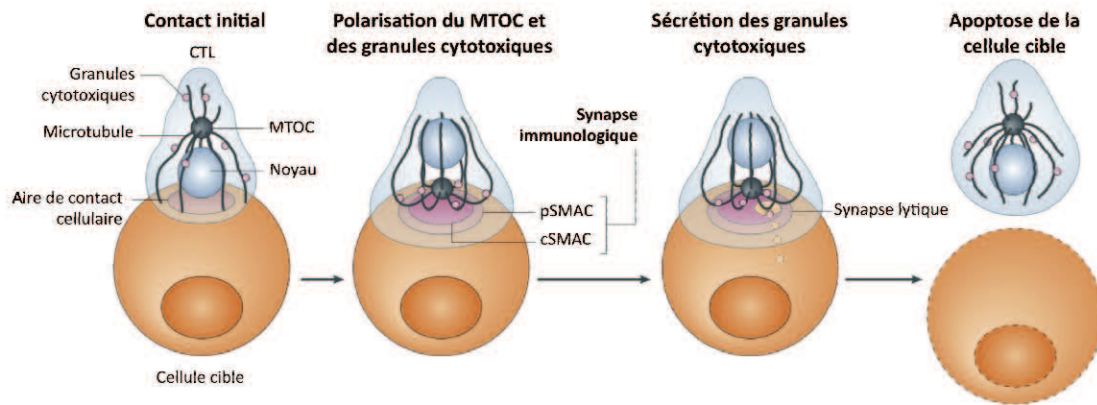


Figure 17: Séquence des évènements de la lyse d'une cellule cible par un CTL

Suite à la reconnaissance spécifique d'une cellule cible, le CTL forme un contact initial avec sa cible. Le CTL réoriente alors rapidement son centre organisateur des microtubules (MTOC, MicroTubule Organizing Centre) ainsi que l'ensemble de son réseau de microtubules en direction du site de contact, où la synapse immunologique s'établit. La synapse cytotoxique est constituée d'un complexe d'activation supramoléculaire central (cSMAC, central SupraMolecular Activation Complex), où les molécules de signalisation et les TCR s'accumulent, entouré par un cercle riche en intégrines, le SMAC périphérique (pSMAC) qui constitue la limite de la synapse. Dans les minutes qui suivent la stimulation, les granules cytotoxiques se déplacent le long des microtubules et se rassemblent autour du MTOC. Ils sont ensuite libérés au niveau de la synapse, par le contact direct du MTOC à la membrane plasmique. Les granules cytotoxiques sont relargués dans la fente synaptique formée entre le CTL et la cellule cible. La libération de perforine permet l'entrée de granzymes dans la cellule cible, entraînant la mort rapide par apoptose.

D'après de Saint Basile *et al.*, 2010.

2.3.2 Rôle cytolytique des lymphocytes T CD8 dans le SNC

2.3.2.1 Engagement du lymphocyte T CD8 avec la cellule cible : formation de la synapse immunologique

La signalisation du TCR, après reconnaissance de l'Ag spécifique associé au CMH-I, entraîne la redistribution et l'accumulation polarisée de molécules du cytosquelette, d'adhésion, de co-stimulation et de transduction du signal du LT CD8 (Figure 17). De ce processus, dirigé vers la cellule cible, résulte la synapse immunologique. Initialement, les molécules de signalisation (le complexe du TCR, le corécepteur CD8 et les molécules de signalisation en aval) ainsi que les molécules d'adhésion (LFA-1, ICAM-1) se rassemblent au centre du site de contact et sont ensuite séparés pour former une structure ordonnée avec les molécules de signalisation au cœur formant le cSMAC (central SupraMolecular Activation Complex). Les molécules d'adhésion forment alors un cercle autour ce qui constitue le pSMAC (peripheral SMAC), excluant d'autres molécules du site de contact, qui forment le dSMAC (distal SMAC).

De plus, le centre organisateur des microtubules (MTOC, MicroTubule Organizing Center) polarise vers le site de contact, permettant aux lysosomes sécréteurs de migrer à la membrane plasmique où ils fusionnent et relarguent leurs effecteurs cytotoxiques dans la fente synaptique.

2.3.2.2 Mode d'action des LT CD8

La cytotoxicité médiée par les LT CD8 est principalement due à trois voies indépendantes : le relarguage, dépendant de la perforine, de granzymes dans la cellule cible ; l'interaction de FasL avec son récepteur Fas à la surface de la cellule cible et la sécrétion de cytokines cytotoxiques comme le TNF- α (Kägi *et al.*, 1994; Lowin *et al.*, 1994) (Figure 18).

La cytotoxicité des granules se produit par libération de la perforine avec les granzymes. La perforine seule peut induire une nécrose rapide de la cellule cible, due

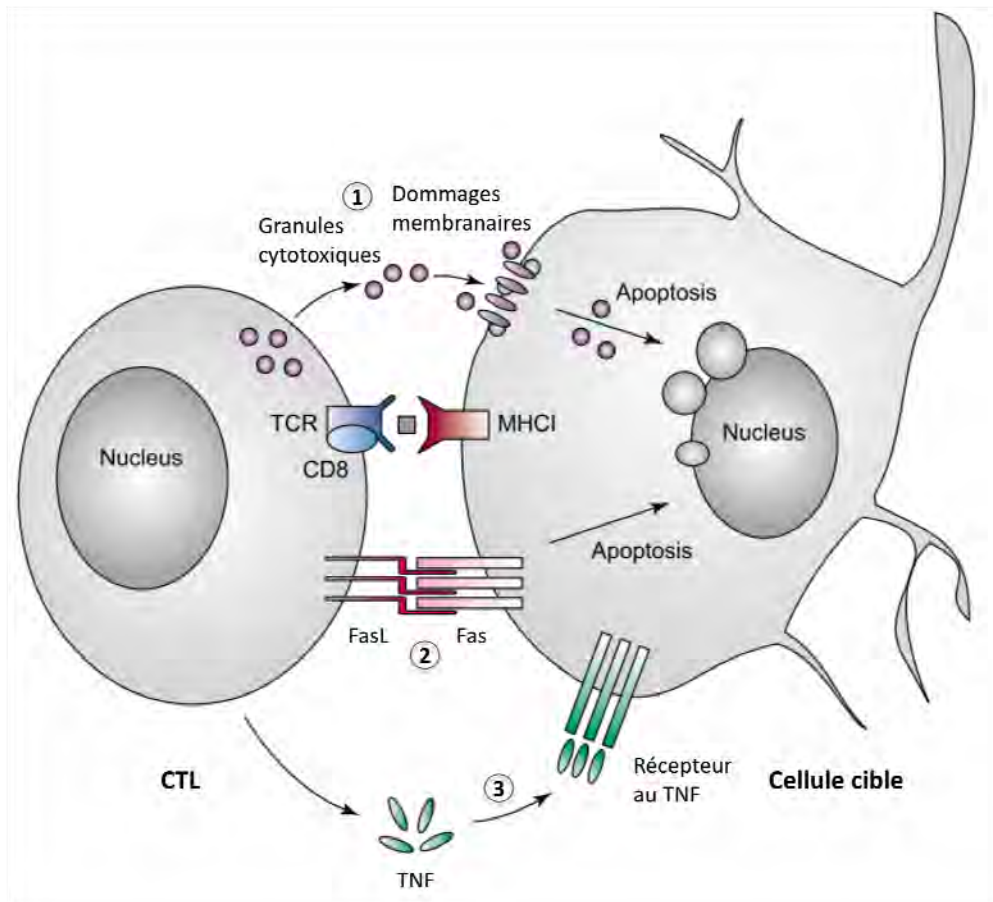


Figure 18: Trois voies différentes de cytolysse utilisées par les CTL

Un CTL reconnaît une cellule cible en liant son TCR au complexe CMH-I/peptide spécifique, exprimée à la surface de la cible. La destruction de cette dernière peut être effectuée par : ① sécrétion de granules cytotoxiques qui altèrent l'intégrité membranaire et induisent l'apoptose ; ② activation du récepteur Fas par son ligand (FasL) exprimé par le CTL, induisant l'apoptose ; ③ et la libération de cytokines, comme le TNF- α .

D'après Neumann *et al.*, 2002.

à la formation de pores transmembranaires qui entraîne le gonflement de la cellule et la rupture de la membrane plasmique (Waterhouse *et al.*, 2006). Par ailleurs, la perforine intervient dans le transport des granzymes à la cellule cible, provoquant l'apoptose en quelques heures (Pipkin & Lieberman, 2007). L'apoptose de la cellule cible peut aussi être provoquée par la liaison des récepteurs de mort (FasL/Fas, TRAIL) (Choi & Benveniste, 2004). Les CTL contribuent également aux lésions inflammatoires en libérant des cytokines cytotoxiques comme l'IFN- γ et le TNF- α (Russell & Ley, 2002).

L'utilisation des voies Fas/FasL ou perforine-granzyme dépend de la force du signal antigénique délivré au LT CD8, c'est-à-dire le nombre de complexes CMH-I/peptide et l'affinité du TCR à ce complexe. En effet, cela entraîne différents signaux calciques intracellulaires : un signal antigénique faible favorise la voie apoptotique médiée par Fas alors qu'un signal fort favorise la voie perforine-granzyme (Esser *et al.*, 1998; Kessler *et al.*, 1998). Avec un TCR de très haute affinité pour le complexe CMH-I/peptide, il a été montré que la présence d'1 à 3 complexes à la surface de la cellule cible était suffisante pour entraîner une réponse du CTL (Purbhoo *et al.*, 2004; Sykulev *et al.*, 1996). En revanche, dans le cas d'un TCR de faible affinité, plusieurs milliers de complexes CMH-I/peptide sont nécessaires pour provoquer la réponse du CTL (Kageyama *et al.*, 1995). Il a été montré qu'*in vitro*, des LT CD8 activés sont capables de tuer des neurones (Manning *et al.*, 1987), soit par la voie perforine/granzyme (Malipiero *et al.*, 1999; Rensing-Ehl *et al.*, 1996) ou par la voie Fas/FasL (Giuliani *et al.*, 2003; Medana *et al.*, 2000).

2.3.2.3 Destruction neuronale par les lymphocytes T CD8

Les conséquences de la reconnaissance de l'Ag par un LT CD8 dans le SNC dépendent du site d'interaction. Dans la substance blanche, seuls les axones démyélinisés sont accessibles aux LT CD8 et peuvent donc en être la cible. Toutefois, que ce soit dans la substance blanche ou grise, l'attaque des neurones par les CTL induit l'augmentation de la concentration calcique intra-axonale et l'activation de protéases dépendantes du calcium (Das *et al.*, 2008). Avec la libération de granzyme

et l'activation des caspases qui en découle, cela provoque la dégradation protéolytique des composants du cytosquelette axonal, entraînant des déficits de transport axonal. Ce phénomène semble être potentiellement réversible, comme cela a été récemment démontré *in vivo* (Nikić *et al.*, 2011). Parallèlement, l'afflux massif d'ions dans le cytoplasme axonal perturbe la balance osmotique (Hasbani *et al.*, 1998), entraînant la formation de renflements localisés de l'axone. Si l'interaction est prolongée, une transection axonale irréversible peut avoir lieu, un phénomène suivi de dégénérescence Wallérienne (Coleman, 2005). Une dégénérescence rétrograde accompagnée d'un signal de mort peut également se produire, entraînant l'apoptose du corps neuronal (Hobom *et al.*, 2004). De plus, la dégénérescence antérograde de l'axone peut aussi induire l'apoptose du neurone afférent dans la substance grise.

Des lésions axonales ont été observées comme étant une conséquence de l'expression de l'Ag par les neurones (Sanchez-Ruiz *et al.*, 2008) et les oligodendrocytes (Saxena *et al.*, 2008) après transfert adoptif chez les souris receveuses de LT CD8 activés *in vitro*. Des preuves indirectes en faveur de lésions axonales dépendantes du CMH-I ont été apportées par le modèle d'infection par TMEV. Dans ce modèle, l'infection des oligodendrocytes par le virus entraîne une démyélinisation et une destruction axonale. Des souris déficientes pour le CMH-I sont exemptes de lésions axonales, en dépit d'une démyélinisation prononcée (Rivera-Quiñones *et al.*, 1998). De façon similaire, l'inhibition des LT CD8 préserve les axones sans affecter le degré de démyélinisation (Johnson *et al.*, 2001). C'est également le cas chez des souris infectées déficientes pour la perforine. En revanche, les déficiences pour FasL ou Fas ne protègent pas des lésions axonales (Murray *et al.*, 1998). Ces mécanismes de dommages axonaux semblent être valables en ce qui concerne la destruction des dendrites médiée par les CTL dans la substance grise (Bing Zhu *et al.*, 2003).

Il a été suggéré que les corps neuronaux soient protégés de l'attaque par les CTL en inhibant l'exocytose des granules lytiques grâce à l'interaction entre le FasL neuronal et le récepteur Fas du LT (Medana *et al.*, 2001). Cependant, les CTL

pourraient attaquer le soma neuronal et induire leur mort dans la substance grise (Sanchez-Ruiz *et al.*, 2008). De plus, comme décrit précédemment, le transfert adoptif de LT CD8 activés *in vitro*, ciblant un Ag physiologiquement ou transgéniquement exprimé par les oligodendrocytes ou les astrocytes, entraîne la mort collatérale des neurones dans la substance grise (Huseby *et al.*, 2001; McPherson *et al.*, 2006).

Ainsi, le soma neuronal, comme les neurites, peuvent être attaqués par les LT CD8 au niveau de lésions inflammatoires de la substance blanche et/ou grise.

2.3.2.4 Effets directs et collatéraux des lymphocytes T CD8 sur l'excitabilité neuronale

Au delà d'induire la mort cellulaire, les molécules cytotoxiques des CTL sont capables de perturber le signal électrique des neurones. Si les données expérimentales concernant l'effet de ces molécules sur l'excitabilité électrique des neurones sont peu abondantes, cela a été considérablement étudié pour les cardiomyocytes (Binah, 2002). En quelques minutes, la perforine ou des granules lytiques purifiés entraînent la dépolarisation des cardiomyocytes et une diminution de l'amplitude et de la durée du potentiel d'action. Ces effets sont médiés par la perforine et ne peuvent être induits par les granzymes seuls (Binah *et al.*, 1992). Les monomères de perforine s'assemblent pour former un large pore de façon non sélective dans la membrane de la cellule cible, favorisant le passage transmembranaire d'ions. Ces flux ioniques abrogent les gradients électrochimiques transmembranaires et entraînent une surcharge calcique intracellulaire. Finalement, cela provoque l'arrêt de l'activité électrique et la destruction de la cellule cible.

L'exposition à des anticorps anti-Fas ou à des LT CD8 déficients en perforine induit également des perturbations prononcées de l'activité électrique des cardiomyocytes. Contrairement à l'effet de la perforine, la durée du potentiel d'action est prolongée alors que les autres paramètres (amplitude, dépolarisation membranaire) sont également réduits. L'activation du récepteur Fas entraîne l'activation de la phospholipase C (PLC) et la génération d'1,3,4-inositol-triphosphate

(IP₃) qui induit la libération de Ca²⁺ des compartiments de stockage intracellulaires, augmentant la concentration calcique intracellulaire en quelques heures.

Etant donné que la plupart des éléments cellulaires requis pour la perturbation électrique des cardiomyocytes par les LT CD8 sont aussi présents chez les neurones, il est concevable que des mécanismes similaires entraînent des perturbations de l'excitabilité neuronale suite à l'interaction avec des LT CD8. En effet, en utilisant la technique du "patch clamp" sur des neurones d'hippocampe exprimant le CMH-I et chargés en peptide OVA, il a été démontré une perte immédiate de l'activité électrique à la suite du contact cellulaire avec un LT CD8 spécifique d'OVA activé. Ce phénomène est dû à la formation de pores par la perforine, associée à l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire. Comme pour les cardiomyocytes, la perte d'activité électrique des neurones, dépendante de la perforine, est la conséquence immédiate de l'interaction restreinte par le CMH-I avec un CTL (Meuth *et al.*, 2009). Il est intéressant de noter que les molécules cytotoxiques responsables de cet effet sont relarguées par les LT CD8 mais également par certains LT CD4 cytotoxiques (van de Berg *et al.*, 2008; Hahn *et al.*, 1995). De façon surprenante, l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire dans les neurones peut être induit par ces LT CD4 cytotoxiques indépendamment de leur Ag cible. Ce phénomène peut être inhibé en inactivant la perforine au moyen de la concanamycine A, qui prévient l'acidification des granules lytiques (Kataoka *et al.*, 1994). Cela suggère que la mort neuronale induite par ces LT CD4 cytotoxiques résulte de l'entrée de Ca²⁺ par des pores formés de perforine. De façon intéressante, le CMH-I peut changer de conformation suite à l'altération du potentiel membranaire (Bene *et al.*, 1997), affectant ainsi l'efficacité de la présentation antigénique et la reconnaissance par les LT CD8 (Bacsó *et al.*, 1996).

Les cytokines libérées par les LT dans le milieu extracellulaire peuvent également contribuer aux perturbations électriques des neurones. L'IFN- γ est capable d'induire une excitotoxicité neuronale via la signalisation commune entre son récepteur et un récepteur AMPA/kainate (Mizuno *et al.* 2008). Le TNF- α , une autre cytokine inflammatoire majeure des LT, est également capable de former des

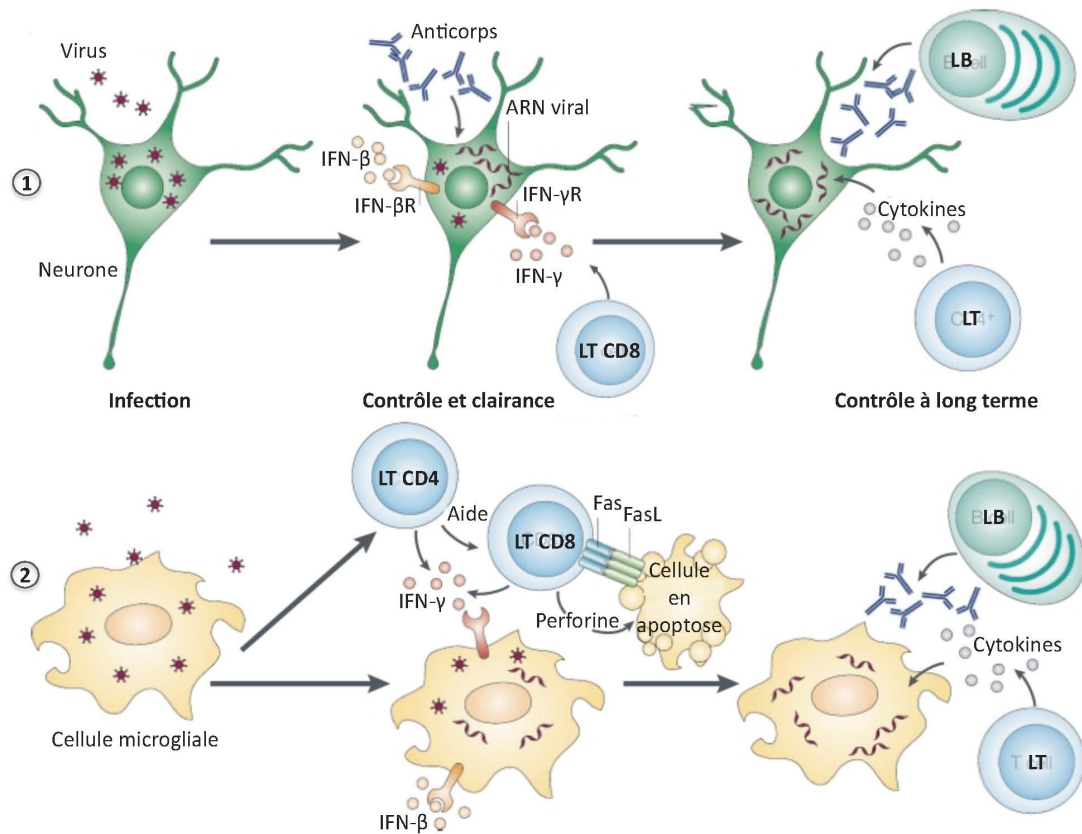


Figure 19: Mécanismes de clairance virale des neurones et de la microglie

① Dans les neurones qui survivent à l'infection virale, le virus est contrôlé initialement par l'IFN- β , puis par les anticorps spécifiques du virus et la production d'IFN- γ par les LT CD8 infiltrants. Cela permet l'inhibition de la réplication virale mais pas nécessairement l'élimination du virus. La présence prolongée de LT produisant de l'IFN- γ ainsi que de LB sécrétant des anticorps spécifiques a probablement un rôle important dans le contrôle à long terme de la réplication virale.

② Le contrôle initial de la réplication virale dans la microglie implique également l'IFN- β . Les LT CD8 infiltrant sont susceptibles de lyser les cellules infectées. Les LT CD4 et CD8 peuvent également produire de l'IFN- γ . Le contrôle à long terme de la réplication virale requiert la production locale d'anticorps spécifiques et de LT produisant de l'IFN- γ .

D'après Griffin, 2003.

canaux ioniques dans les membranes plasmiques (Kagan *et al.*, 1992).

Ainsi, toutes les voies effectrices des LT CD8 sont capables d'interférer avec l'activité électrique des neurones. Cela pourrait avoir des conséquences fonctionnelles au niveau systémique, c'est-à-dire l'apparition de symptômes neurologiques, ou au niveau cellulaire en induisant la surexpression du CMH-I et la donc la cytotoxicité des CTL.

2.3.3 La clairance virale, évaluation et stratégie

La clairance virale, c'est-à-dire l'élimination complète d'un virus des cellules du parenchyme cérébral, se déroule en plusieurs étapes. D'abord, il y a une inhibition de la dissémination virale à d'autres cellules, puis l'élimination des particules virales libres. Par la suite, les cellules infectées sont éliminées, ou la réplication virale intracellulaire est inhibée de façon permanente.

Le moyen le plus fiable pour éliminer complètement un virus d'un tissu est l'élimination de toutes les cellules infectées, que ce soit par cytolysse induite par le virus ou par le système immunitaire. Toutefois, les neurones du SNC mature et beaucoup de cellules gliales sont relativement résistants à la cytolysse. Le fait que les neurones soient des cellules à faible capacité de renouvellement explique sans doute cette résistance à l'apoptose. En cas de survie des cellules infectées, la clairance virale doit alors faire appel à des mécanismes d'inhibition de la synthèse intracellulaire de l'acide nucléique et des protéines virales, ainsi qu'à la suppression du génome viral des cellules. Si la clairance est incomplète, des mécanismes doivent alors être mis en place afin de prévenir la réactivation du virus (Irani & Griffin, 1996).

Les processus immunologiques requis pour la clairance virale sont spécifiques du type cellulaire. Par conséquent, le contrôle de la réplication virale peut être obtenu dans une population cellulaire cible (par exemple, les neurones) mais pas dans une autre (par exemple, les cellules gliales) (Figure 19).

2.3.3.1 Clairance et contrôle de la réplication virale dans les cellules gliales

Dans les modèles les plus étudiés d'infection des cellules gliales, c'est-à-dire l'infection par TMEV ou MHV, les mécanismes de clairance virale sont inefficaces et une infection persistante s'établit, entraînant une maladie démyélinisante chez les souches de souris susceptibles.

L'infection par TMEV cause d'abord une encéphalite impliquant surtout l'infection de neurones, suivie par une infection persistante des cellules gliales chez les souches de souris susceptibles. La clairance du TMEV chez les souris ne développant pas d'infection persistante ou de maladie démyélinisante, est dépendante d'une réponse rapide médiée par les LT CD8 (Marten *et al.*, 2000). Chez les souris susceptibles à l'infection persistante, le virus est éliminé des neurones mais pas des oligodendrocytes, des astrocytes et de la microglie, bien que sa réplication soit atténuée.

La souche JHM du MHV (MHV4) infecte principalement les cellules gliales. Bien que l'administration passive d'anticorps puisse protéger les souris d'une encéphalomyélite fatale, chez les souches qui éliminent l'infection, les anticorps ne sont détectables qu'après l'élimination du virus. Ceci laisse penser que la réponse anticorps n'est pas le mécanisme principal de clairance virale. La réduction de la réplication virale peut être médiée par les LT CD4 ou CD8 et le transfert de LT CD4 ou CD8 spécifiques du virus protège de l'encéphalite fatale induite par MHV (Stohman *et al.*, 1995), ce qui confirme un rôle important des LT dans le contrôle de la réplication virale. Le mécanisme de clairance du MHV médiée par les LT est spécifique du type de cellule gliale (Yamaguchi *et al.*, 1991). L'IFN- γ est particulièrement important pour la clairance du MHV des oligodendrocytes, alors que la perforine et donc probablement la lyse médiée par les CTL, est importante pour la clairance virale des astrocytes et de la microglie (Körner *et al.*, 1991). La clairance virale a lieu chez des souris déficientes en perforine mais est retardée, révélant que plusieurs mécanismes entrent en jeu (Parra *et al.*, 1999). Des rôles auxiliaires dans la clairance virale ont été identifiés pour les LT CD4, Fas et l'IFN- γ (Lin

et al., 1997). L'aide des LT CD4 est nécessaire pour empêcher l'apoptose des LT CD8 dans le SNC, ainsi que pour l'expression de leur fonction cytotoxique (Lin *et al.*, 1998).

2.3.3.2 Clairance et contrôle de la réplication virale dans les neurones

2.3.3.2.1 Clairance virale dépendante des lymphocytes T CD8

Les LT CD8 sont les principaux inhibiteurs de la réplication virale dans les neurones et peuvent exercer leur fonction antivirale par un processus non-cytolytique médié par des cytokines, ou par un processus cytolitique qui implique soit les molécules cytotoxiques perforine et granzyme, soit l'interaction Fas-FasL.

Le mécanisme prédominant de contrôle viral par les LT dans le SNC est la production d'IFN- γ , bien que des rôles distincts mais interdépendants de la perforine et de l'IFN- γ soient évidents dans de nombreux modèles (Divito *et al.*, 2006). Puisque durant la plupart des infections virales, les neurones, les oligodendrocytes et les astrocytes n'expriment pas de CMH-II, les LT CD4 sont considérés comme ayant un rôle auxiliaire (T helper) plutôt qu'une activité antivirale directe.

La fonction des LT CD8 est fortement dépendante de l'expression d'IFN- γ qui augmente rapidement lors de la réaction inflammatoire induite par une infection virale (Griffin, 2003; Divito *et al.*, 2006). Alors que les cellules infectées relarguent de l'IFN- α/β , les LT CD8 produisent de l'IFN- γ . Comme l'entrée de ces cellules dans le SNC est minimale en conditions physiologiques, l'IFN- γ n'y est pas détectable (Rottenberg & Kristensson, 2002). Le rôle de l'IFN- γ dans la protection du SNC et la clairance virale a été décrit pour de nombreux virus neurotropes (Fabry *et al.*, 1994). Les neurones infectés par SINV sont capables de répondre à l'IFN- γ en diminuant la réplication virale, soit en interférant avec des protéines virales ou en diminuant la synthèse d'ARN (Hausmann *et al.*, 2005; Patterson *et al.*, 2002; Shrestha *et al.*, 2006). La réponse neuronale directe à l'IFN- γ est médiée par l'expression de gènes antiviraux (Burdeinick-Kerr & Griffin, 2005). Par exemple, le gène de l'oxyde nitrique synthétase, induit par l'IFN- γ dans les neurones, est important pour supprimer la

réplication de VSV. La déficience pour ce gène aggrave la pathologie due à l'infection par SINV, augmentant le taux de mortalité chez des souris infectées (Chesler & Reiss, 2002).

De façon remarquable, la clairance virale médiée par l'IFN- γ diffère entre les populations neuronales. Les motoneurones de la moelle épinière sont capables de complètement éliminer l'infection en l'absence d'anticorps, alors que les neurones corticaux ont besoin d'anticorps pour éliminer le SINV (Chesler & Reiss, 2002). De même, la protection par l'IFN- γ des neurones infectés par BDV est totale sur des cultures de cervelet alors que des neurones hippocampaux ne sont que partiellement protégés (Griffin, 2003). La raison de cette disparité n'est pas connue et pourrait être due à des différences quant à la capacité à lier l'IFN- γ ou à répondre à l'IFN- γ (Friedl *et al.*, 2004). Le récepteur à l'IFN- γ est largement exprimé par les neurones et son expression constitutive est notablement plus forte que chez les cellules gliales (Pierce *et al.*, 2005). Il est intéressant de relever que certains neurones peuvent produire de l'IFN- γ (Robertson *et al.*, 2000). Des effets autocrines liés à l'IFN- γ pourraient jouer un rôle dans la clairance virale. Dans tous ces exemples de virus neurotropes, aucune particule virale ne peut être retrouvée libre dans le SNC bien que l'ARN viral soit détectable. Cet ARN réside probablement dans les neurones infectés qui ont survécu à l'infection et à la clairance médiée par le système immunitaire (Eneroth *et al.*, 1992).

L'IFN- γ a également un effet bénéfique sur la survie (Hawke *et al.*, 1998), la croissance et la différenciation neuronales *in vitro* (Erkman *et al.*, 1989).

2.3.3.2.2 Clairance virale dépendante des anticorps

Les anticorps antiviraux sont importants pour la clairance du virus de la rage, SINV, MHV et TMEV des neurones (Jonakait *et al.*, 1994). Les LB antiviraux sécrétant des anticorps infiltrent le SNC lors de la réponse inflammatoire et y sont retenus (Levine *et al.*, 1991). La plupart des anticorps associés à la protection ou la clairance sont spécifiques de protéines des virus et inhibent la réplication virale *in*

vitro (Tschen *et al.*, 2002; Tyor *et al.*, 1992). Le mécanisme par lequel un anticorps spécifique d'une glycoprotéine virale inhibe la réplication virale n'est pas complètement compris, mais a été notamment étudié dans le détail pour SINV. L'effet antiviral des anticorps dirigés contre la glycoprotéine E2 de SINV ne nécessite pas l'apport des cellules phagocytaires ou de molécules du complément, mais nécessite que les anticorps soient bivalents (Levine *et al.*, 1991). Ceci implique que le "crosslinking" des protéines virales à la surface de la cellule infectée est nécessaire pour le contrôle de la réplication virale. Le traitement de cellules infectées de manière persistante par SINV avec des anticorps entraîne la restauration de la synthèse des protéines de l'hôte, inhibée par la réplication virale (Levine *et al.*, 1991). La clairance de SINV, tout comme celle d'autres virus qui infectent les neurones, est incomplète puisque l'ARN viral peut être détecté tout au long de la vie de l'animal (Després *et al.*, 1995). La sécrétion à long terme d'anticorps dans le cerveau de souris qui se sont rétablies de l'infection indique qu'il y a un besoin perpétuel de contrôle par le système immunitaire de la réplication virale (Tyor *et al.*, 1992).

2.3.4 Contrôle de la réplication virale et régulation de la réponse immunitaire adaptative

Les virus à ARN peuvent persister et de ce fait un contrôle permanent de la réplication virale par le système immunitaire est essentiel. Les LT CD8 antiviraux sécrétant de l'IFN- γ sont retenus dans le SNC et pourraient ainsi contribuer au processus démyélinisant qui suit le rétablissement d'une infection virale aiguë. Les LT CD4 peuvent également subsister dans le SNC pendant plusieurs semaines (Marten *et al.*, 2000). Malgré l'absence d'arguments en faveur d'un rôle des anticorps dans la clairance du MHV, les LB sécrétant les anticorps sont essentiels pour empêcher une réplication virale accrue (Marten *et al.*, 2000). Le nombre de LT diminue éventuellement mais les LB persistent. Bien que les LB puissent être cytotoxiques *in vitro*, ceci n'a pas été confirmé *in vivo*.

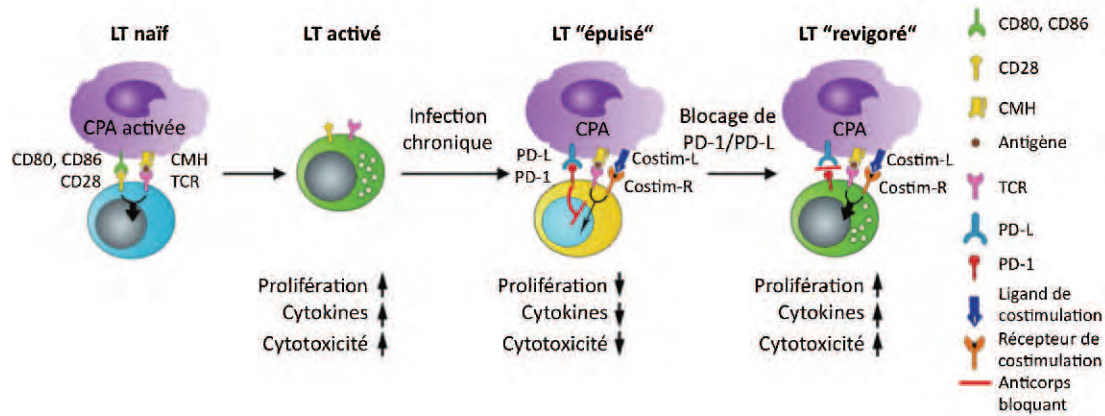


Figure 20 : L'interaction PD-1/PD-L contribue directement à l'épuisement des LT durant une infection virale chronique

Les CPA activés expriment les molécules de costimulation CD80 et CD86 et stimulent la prolifération, la production de cytokines et l'activité cytolytique des LT naïfs, ce de façon spécifique de l'Ag. Lors d'une infection chronique ou en présence d'un Ag persistant, les LT s'épuisent et perdent leur capacité de prolifération et leur pouvoir cytolytique. Ces LT "épuisés" expriment fortement PD-1 et reçoivent un signal inhibiteur via l'interaction avec PD-L exprimé par les CPA. Le blocage de cette interaction peut "revigorer" les LT afin qu'ils récupèrent leur fonction effectrice, incluant la production de cytokines et la cytolyse.

D'après Sharpe *et al.*, 2007.

L'IFN- γ permet aussi la protection neurale de l'encéphalite causée par HSV-1 en inhibant l'apoptose induite par le virus. Dans le cas particulier de l'infection par HSV-1, il a été observé que la protéine virale ICP4 était un substrat du granzyme B (Knickelbein *et al.*, 2008). De ce fait, les LT CD8 sont capables de contrôler la réplication virale de façon non lytique, par le relargage de granules de granzyme B. La concentration en IFN- γ , relarguée lors d'infections chroniques et aiguës, et les réactions immunitaires sont maintenues après la clairance virale et pendant la latence virale (Tschen *et al.*, 2002). Toutefois, l'exposition prolongée de neurones à l'IFN- γ , à des concentrations similaires à celles détectées après une infection virale chronique, est corrélée avec la rétraction des dendrites (Fan *et al.*, 1993). L'IFN- γ a donc probablement un rôle à double tranchant dans la réponse antivirale : il permet la clairance virale tout en contribuant à la pathologie, en induisant la rétraction des dendrites. Il est intéressant de noter la coïncidence entre rétraction des dendrites (Li *et al.*, 1999; Masliah *et al.*, 1997) et expression élevée d'IFN- γ dans beaucoup de réactions inflammatoires aiguës, notamment celles provoquées par une lésion traumatique ou un accident vasculaire cérébral.

L'incapacité des LT CD8 à éliminer efficacement des virus du SNC nécessite une étude plus approfondie des mécanismes mis en jeu mais plusieurs concepts émergent pour expliquer cet échec du système immunitaire. L'un de ces concepts est la perte de fonction des CTL lors d'une infection virale persistante (Lau & Yu, 2001). En effet, l'épuisement des CTL durant une infection virale chronique serait lié à l'exposition permanente avec l'Ag et la surexpression de la protéine membranaire PD-1 (Programmed Death 1), connue pour réguler négativement la réponse immunitaire. La fonction des LT CD8 pourrait être ainsi augmentée en bloquant ou activant sélectivement des molécules modulatrices. L'efficacité de cette approche a été démontrée en bloquant l'interaction inhibitrice PD-L1/PD-1 lors de l'infection persistante par LCMV (Bergmann *et al.*, 1999; Ramakrishna *et al.*, 2006). De telles stratégies pourraient être appliquées aux cas d'infections persistantes du SNC (Figure 20).

De plus, les interactions inhibitrices entre le récepteur NKG2A (qui dimérise avec CD94) sur les LT CD8 et son ligand Qa-1b sur les neurones pourraient modérer les fonctions effectrices des CTL durant l'infection par HSV-1 (Barber *et al.*, 2006). Dans un modèle d'infection de la cornée par HSV-1, la plupart des CTL producteurs de granzyme expriment NKG2A mais ont une cytotoxicité plus faible vis à vis de cellules cibles exprimant Qa-1. En bloquant *in vitro* cette interaction Qa-1/NKG2A avec un anticorps anti-Qa-1, la cytotoxicité peut être rétablie (Suvas *et al.*, 2006). Cette étude montre également qu'approximativement 35% des neurones trigéminaux infectés de façon latente expriment Qa-1 (Wojtasiak *et al.*, 2004). En revanche, la surexpression des ligands de NKG2D, RAE-1, MULT1 et HS60 dans le modèle d'infection par MHV augmente les capacités cytotoxiques des CTL sans affecter la production d'IFN- γ (Suvas *et al.*, 2006). Ces travaux font émerger le rôle crucial de l'IFN- γ , qui adopte des mécanismes effecteurs différents pour contrôler la réplication virale au sein d'un même organe cible, le SNC.

Une autre raison à la régulation de la réponse immunitaire adaptative est l'expression différentielle des molécules de CMH et des ligands inhibiteurs et activateurs à la surface des cellules résidentes du SNC. Différents niveaux d'expression basale d'ARNm codant le CMH-I chez les sous-types de cellules gliales, ainsi que leur capacité de réponse à l'IFN- α/β et l'IFN- γ sont associés à une expression retardée du CMH-I à la surface des astrocytes et des oligodendrocytes comparée à la microglie lors de l'infection par MHV (Walsh *et al.*, 2008). Les neurones pourraient échapper à la reconnaissance par les LT CD8 de part leur défaut d'expression de molécules de CMH-I, l'expression de molécules anti-apoptotiques ainsi qu'une susceptibilité différente à l'IFN- γ . Il est également intéressant de noter que de façon similaire aux protéines virales qui bloquent l'IFN- α/β , les *Herpesviridae* et *Retroviridae* expriment des protéines qui diminuent la présentation antigénique par le CMH afin d'échapper à la reconnaissance par les LT effecteurs (Burdeinick-Kerr & Griffin, 2005; Divito *et al.*, 2006).

L'immunité humorale contourne cette dépendance des LT au CMH. La production intrathécale soutenue d'anticorps par des LB spécifiques du virus est

associée avec le contrôle mais pas l'élimination du virus durant des infections persistantes du SNC (Doom & Hill, 2008; Antoniou & Powis, 2008). Cependant, peu de choses sont connues sur le recrutement des LB et leur mécanisme d'action dans le SNC. L'expression prolongée de chimiokines et du facteur de survie BAFF suggère que la neuroinflammation induite par un virus maintient un environnement qui favorise les LB protecteurs.



Figure 21 : Description du virus de Borna comme “le virus qui rend triste” avec “le cauchemar” de Johan Heinrich Füssli

D’après le journal Die Zeit 1999.

3 Le virus de Borna : description et physiopathologie de la maladie

Pour mon travail de thèse, j'ai utilisé le modèle de neuroinflammation induite chez le rat Lewis adulte après infection intracérébrale avec le virus de Borna (BDV). Dans cette dernière partie, je décrirai d'abord ce virus à ARN de l'ordre des *Mononegavirales*, les pathologies naturelles associées et enfin, la physiopathologie de divers modèles d'infection expérimentale.

3.1 Introduction

La maladie de Borna est connue depuis le XVIII^e siècle puisque des traités de médecine vétérinaire allemands de cette époque font déjà référence à une encéphalite affectant de façon sporadique les chevaux et les moutons (Von Sind, 1781). Ce n'est qu'un siècle plus tard, en 1895, à l'occasion d'une épidémie qui décima les chevaux d'un régiment de cavalerie prussienne dans l'Est de l'Allemagne, et notamment dans la ville de Borna, que le terme de maladie de Borna fut introduit. La nature infectieuse de l'agent causal fut ensuite démontrée en transmettant la maladie à des animaux sains en leur inoculant des homogénats de cerveaux d'animaux malades (Ludwig & Bode, 2000).

Les analyses moléculaires ont permis de démontrer que le virus de Borna (Borna Disease Virus, BDV) est un virus enveloppé dont le génome est composé d'une molécule d'ARN simple brin non segmenté, de polarité négative (Figure 22). Il appartient donc à l'ordre des *Mononegavirales* (Zwick & Seifried, 1925; Zwick, 1939), qui inclut notamment des virus tels que le virus de la stomatite vésiculaire et de la rage (*Rhabdoviridae*), le virus de la rougeole (*Paramyxoviridae*) ou les virus Ebola et Marburg (*Filoviridae*). Contrairement aux autres membres des *Mononegavirales*, le BDV se caractérise par un cycle de répllication et transcription qui s'effectue dans le

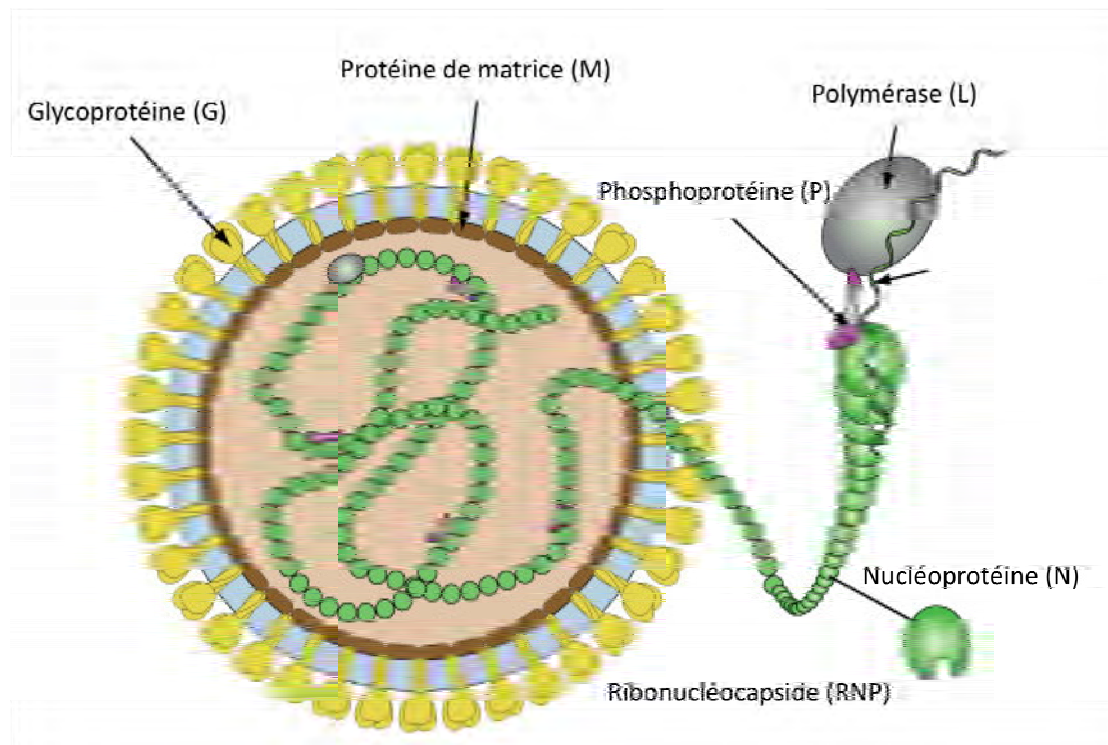


Figure 22: Représentation schématique des protéines du virus de Borna

noyau cellulaire, conduisant à son classement dans une nouvelle famille : les *Bornaviridae*.

Le BDV possède un tropisme marqué pour les neurones, dans lesquels il persiste sans destruction associée. En effet, il n'est absolument pas cytolytique, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Le BDV possède un spectre d'hôte très large puisque l'infection naturelle a été décrite dans de nombreuses espèces animales, parmi lesquelles les chevaux, les moutons, le chat, le chien et plus récemment le macaque et le perroquet (Briese *et al.*, 1994; Cubitt & de la Torre, 1994; Kistler *et al.*, 2008). Par ailleurs, des infections expérimentales ont été réalisées dans de très nombreuses espèces de vertébrés, allant du poulet au macaque rhésus en passant par la souris et le rat (Hagiwara *et al.*, 2008). *In vitro*, le BDV est capable d'infecter et de se répliquer dans un grand nombre de lignées cellulaires neuronales et non neuronales.

Le BDV est responsable d'une infection persistante du SNC et entraîne des signes cliniques extrêmement variés. L'infection peut être asymptomatique ou peut conduire à des signes cliniques allant de troubles du comportement divers à une méningo-encéphalite fatale. L'expression clinique dépend de l'espèce animale considérée, mais aussi de l'âge et du statut immunitaire de l'hôte (Ludwig & Bode, 2000).

3.2 Génome et protéines du BDV

3.2.1 Organisation génomique

Le génome du BDV est constitué d'une molécule d'ARN simple brin non segmenté, de polarité négative, d'environ 8,9 kb (Ludwig & Bode, 2000). C'est le génome le plus compact de l'ordre des *Mononegavirales*. Il sert de matrice à la synthèse d'ARN selon deux procédés distincts : la transcription pour générer des ARNm et la réplication du génome via la production d'un anti-génome de polarité positive servant de support pour la production de génomes de polarité négative.

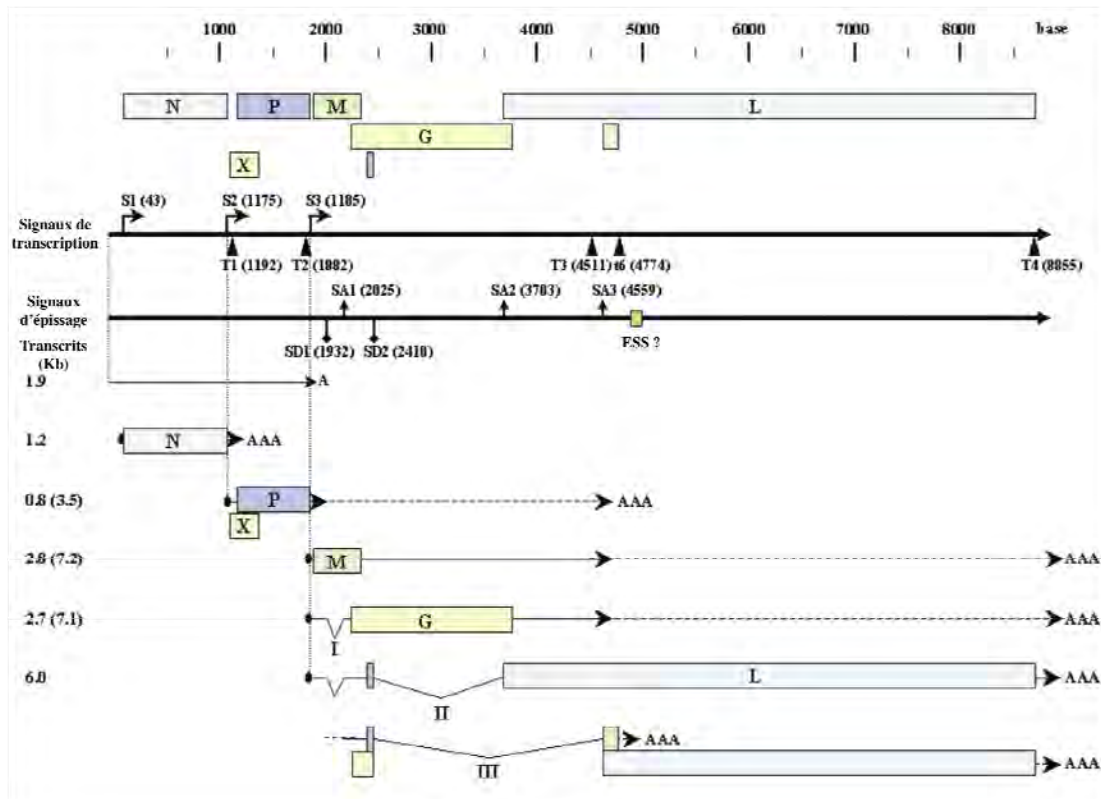


Figure 23 : Organisation génomique du BDV

Les positions des phases ouvertes de lecture correspondant aux différentes protéines du BDV sont indiquées en haut de la figure. Les séquences signal d'initiation et de terminaison de la transcription sont indiquées par les symboles S et T. Les séquences donneuses et acceptrices d'épissage sont indiquées par les symboles SD et SA. ESS fait référence à un signal putatif suppresseur d'épissage identifié récemment. La numérotation des différentes séquences signal (indiquée entre parenthèses) est indiquée par rapport à l'antigénome. Les ARN subgénomiques produits lors de la transcription virale sont indiqués au bas de la figure. Les positions des trois introns (I, II, III) sont également indiqués.

D'après Tomonaga *et al.*, 2002.

De façon remarquable comparée aux autres *Mononegavirales*, toutes les souches isolées de BDV présente une grande stabilité génomique, à l'exception notable de la souche No/98. La variation de séquence entre les ARN viraux provenant de prélèvements humains et animaux n'est que de 3 à 4% au niveau nucléotidique (de la Torre, 1994; Schneemann *et al.*, 1995). L'analyse des séquences de BDV isolés de différentes espèces animales et de différentes zones géographiques révèle un grand degré de conservation des séquences (Bode *et al.*, 1996; de la Torre *et al.*, 1996; Planz *et al.*, 1999). Cette caractéristique suggère l'existence d'espèces servant de "réservoirs" chez lesquelles le virus serait retrouvé préférentiellement et aurait évolué pour atteindre une adaptation optimale.

L'ARN génomique comporte au moins 6 phases ouvertes de lecture, qui codent de 3' en 5' pour : la nucléoprotéine p40/38 (N), la phosphoprotéine p24/16 (P), la protéine de matrice gp18 (M), la protéine d'enveloppe gp84 (G) et une ARN polymérase dépendante de l'ARN p190 (L). De plus, une petite phase ouverte de lecture chevauchant celle de la P code pour la protéine p10 (X) (Figure 23).

3.2.2 Les protéines du BDV

3.2.2.1 La nucléoprotéine N

La première phase ouverte de lecture code la nucléoprotéine N, qui est la protéine virale la plus abondamment retrouvée. Elle représente le constituant essentiel des complexes ribonucléoprotéiques viraux (RNP) et recouvre l'ARN génomique du virus, le protégeant ainsi des RNases cellulaires. Il a aussi été suggéré que cette protéine serait primordiale pour la localisation nucléaire des RNP (Richt & Rott, 2001). De plus, il a été démontré qu'un épitope dérivé de la nucléoprotéine était immunodominant dans la réponse médiée par les LT CD8 (Planz & Stitz, 1999).

3.2.2.2 La protéine X

Le transcrit de 0,8 kb est le plus petit du génome viral. Il est bicistronique et code la protéine X de 10 kDa et la protéine P de 24 kDa, qui sont toutes les deux abondamment exprimées dans les cellules infectées.

Bien qu'il ait été initialement rapporté que la protéine X présente une localisation nucléaire dans les cellules infectées, sa localisation est majoritairement cytoplasmique après transfection (Kobayashi *et al.*, 1998). Comme la protéine X interagit avec les protéines P et N, ceci expliquerait sa localisation nucléaire lors de l'infection. Dans le noyau, elle intervient dans la régulation de l'activité polymérase et elle est essentielle pour la production de particules virales. En effet, une mutation abolissant son interaction avec la protéine P empêche toute production de virus recombinants (Wolff *et al.*, 2002). Il a également été récemment démontré que la protéine X a un rôle anti-apoptotique. La X est en effet présente en grande majorité au niveau des mitochondries et protège les cellules de l'apoptose induite par Fas. En bloquant la localisation mitochondriale de la protéine X, cet effet anti-apoptotique est aboli (Poenisch *et al.*, 2009).

3.2.2.3 La phosphoprotéine P

La protéine P est un cofacteur essentiel de la polymérase virale et est également un constituant majeur des RNP. Elle interagit avec les protéines N, L et X. Lorsqu'elle est exprimée seule dans les cellules, la protéine P est majoritairement nucléaire. En revanche, dans les cellules infectées, elle est initialement localisée dans le noyau puis se répartit au cours de l'infection de façon équivalente entre cytoplasme et noyau. La protéine P interagit aussi avec de nombreuses protéines cellulaires.

La protéine P est ainsi phosphorylée par des kinases cellulaires dont la PKC ϵ , la caséine kinase II (Schwemmler *et al.*, 1997) et la protéine kinase 1 liant l'activateur de NF- κ B associé au membre de la famille Traf, plus communément appelée « TANK-Binding Kinase-1 » ou TBK-1 (Unterstab *et al.*, 2005). La P, phosphorylée par TBK-1,

entrerait en compétition avec des substrats endogènes. Il a été démontré récemment que la phosphorylation par la PKC jouerait un rôle inhibiteur dans l'activité co-transcriptionnelle de la protéine P (Schmid *et al.*, 2007). Enfin, en interagissant avec la PKC ϵ , la protéine P inhibe la phosphorylation d'autres substrats neuronaux de cette kinase, comme MARCKS, SNAP25 ou Munc18 (Volmer *et al.*, 2006).

La protéine P interagit également avec HMGB1 (également appelée amphotérine), conduisant à l'inhibition de ses fonctions (Schneider *et al.*, 2004). L'amphotérine est une protéine qui régule la transcription des gènes cellulaires et qui est impliquée dans la régulation de la croissance des prolongements neuronaux.

Enfin, une équipe a récemment démontré que la phosphoprotéine du BDV interagissait aussi avec une protéine associée au récepteur à l'acide gamma amino butyrique A (GABARAP) (Peng *et al.*, 2008). GABARAP interagit avec les sous unités du récepteur au GABA, ainsi qu'avec les microtubules. Cette interaction pourrait donc interrompre l'adressage des récepteurs GABA à la membrane cellulaire. La conclusion de ces travaux est que la P, en interagissant avec GABARAP, perturberait la réponse au GABA des neurones.

3.2.2.4 La protéine de matrice M

La protéine de matrice M est indispensable au bourgeonnement des particules virales et joue probablement un rôle dans la formation de la RNP (Perez & de la Torre, 2005). Elle possède des propriétés originales pour un virus de l'ordre des *Mononegavirales*. En règle générale, la protéine M inhibe la transcription et son accumulation au cours de l'infection signale que suffisamment de protéines de structure sont disponibles pour l'assemblage des particules virales. La protéine M du BDV peut quant à elle se lier à la P mais pas à la N et elle n'inhibe pas la transcription. Le BDV produit très peu de particules virales, ce qui pourrait être lié au fait que la protéine M ne joue pas ce rôle inhibiteur de la transcription. Ce mécanisme pourrait être une adaptation du virus à une infection persistante et non cytotytique, avec peu de relargage de particules virales.

3.2.2.5 La protéine d'enveloppe G

Les protéines d'enveloppe des virus à ARN sont des glycoprotéines exprimées à la surface des virions. Tout comme la protéine M, elles sont impliquées dans la maturation, l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales. La glycoprotéine du BDV nécessite une maturation via une étape de digestion par une endoprotéase, la furine (Neumann *et al.*, 2009). Il y a ainsi génération de deux peptides : une BDV-GP-C correspondant à la partie C-terminale et un peptide BDV-GP-N correspondant à la partie N-terminale. La grande majorité des protéines G sont synthétisées et accumulées dans le réticulum endoplasmique (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1997), seule la partie BDV-GP-C parvient à la membrane cellulaire. La partie BDV-GP-N est suffisante pour la reconnaissance par le récepteur de l'hôte, tandis que la partie BDV-GP-C intervient dans la fusion membranaire dépendante de la baisse du pH (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1997). Malgré des localisations cellulaires différentes, les deux peptides BDV-GP sont présents dans les particules virales (Perez *et al.*, 2001). Cela impose donc une restriction supplémentaire à la production de particules virales.

3.2.2.6 La polymérase L

La séquence de la polymérase L occupe la majeure partie du génome. Elle interagit avec la protéine P (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1997). La réplication et transcription du génome du BDV ayant lieu dans le noyau, c'est également la localisation de la polymérase L.

3.3 Epidémiologie

3.3.1 Méthodes diagnostiques

L'épidémiologie de la maladie de Borna demeure mal connue. Le principal obstacle est la difficulté du diagnostic de l'infection par le BDV. Les chevaux et les

moutons infectés présentent des signes cliniques variés, principalement des troubles comportementaux, une apathie et des déficits locomoteurs. Ces signes cliniques ne sont pas spécifiques de l'infection par le BDV et le diagnostic clinique est donc impossible. Des examens complémentaires sont nécessaires mais il faut préciser qu'aucune méthode diagnostique *intra vitam* fiable et standardisée n'existe pour le moment. A ce jour, le seul test standard permettant de diagnostiquer avec certitude une infection par le BDV est une analyse *post mortem* des tissus cérébraux. La difficulté du diagnostic *intra vitam* peut s'expliquer par les caractéristiques propres de l'infection par le BDV. En particulier, le virus se réplique peu dans l'organisme, induit des réponses sérologiques très limitées et est retrouvé à de très faibles taux dans les excréments des animaux infectés.

3.3.2 Epidémiologie de l'infection animale

Historiquement, la maladie de Borna a été décrite comme une maladie associée à une inflammation du SNC. Durant de longues années, il était admis qu'une infection par le BDV conduisait systématiquement à l'apparition d'une telle pathologie. Cependant, il a été mis en évidence plus récemment que de nombreux animaux cliniquement sains possédaient des anticorps anti-BDV ou de l'ARN viral (Walker *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2004). Cette observation suggère que l'infection naturelle pourrait être asymptomatique dans un grand nombre de cas, ou se traduire par d'autres signes cliniques que ceux d'une méningo-encéphalite.

3.3.2.1 Région de répartition endémique

Les principales espèces animales infectées sont les chevaux et les moutons. Dans ces espèces, la maladie de Borna classique apparaît sporadiquement, avec une incidence légèrement plus élevée au printemps et au début de l'été.

La seule épidémie décrite est celle survenue entre 1894 et 1896 au sein d'un régiment de cavalerie prussienne basée dans la ville de Borna, en Allemagne. La maladie semble désormais endémique en Europe centrale, en particulier

l'Allemagne, la Suisse, l'Autriche et la principauté du Lichtenstein (Nakamura *et al.*, 1995; Vahlenkamp *et al.*, 2000; Vahlenkamp *et al.*, 2002). L'incidence de la maladie de Borna reste cependant faible. Actuellement, environ 100 chevaux et 100 moutons infectés par le BDV sont diagnostiqués chaque année dans la zone d'endémie. Dans les troupeaux de moutons, la maladie apparaît souvent chez plusieurs animaux en même temps. En revanche, rarement plus de deux animaux sont atteints dans les élevages de chevaux (Staheli *et al.*, 2000).

Différentes études épidémiologiques suggèrent que le spectre d'hôte du BDV ainsi que sa distribution géographique sont beaucoup plus larges que suspecté initialement. En dehors de la région endémique, le taux de prévalence du BDV est cependant nettement moins élevé. Une nouvelle région endémique a été décrite au Japon (sur l'île d'Hokkaido où étaient importés des chevaux venant d'Allemagne) et quelques cas d'infections isolés ont été diagnostiqués en Europe du Nord, aux Etats-Unis et en Israël (Richt *et al.*, 1997). L'infection par le BDV n'est donc pas restreinte à la zone d'endémie. On peut penser que l'Europe centrale constitue le foyer initial de la maladie, mais le développement du commerce international a sans doute contribué à la diffusion mondiale du BDV. En effet, de très nombreuses études indiquent la présence d'anticorps anti-BDV ou d'ARN viral chez des chevaux ou des moutons provenant de nombreuses régions du monde. Des animaux porteurs d'ARN viral détecté ont par exemple été mis en évidence par PCR en France.

3.3.2.2 Spectre d'hôte

Les données épidémiologiques actuelles suggèrent que de nombreuses espèces animales peuvent être également infectées naturellement par le virus. L'infection a ainsi pu être mise en évidence chez les bovins (Dauphin *et al.* 2002), le chien et le chat (Berg & Berg, 1998; Lundgren *et al.*, 1995; Reeves *et al.*, 1998; Weissenböck *et al.*, 1998). Des animaux de zoo (macaques, alpacas, hippopotame, lama) ont été déclarés porteurs du BDV (Richt & Rott, 2001) ainsi que des animaux sauvages comme le renard (Dauphin *et al.*, 2002).

Enfin, il a été récemment démontré que les oiseaux, et notamment les perroquets, pouvaient être infectés par le BDV (Kistler *et al.*, 2008).

3.3.2.3 Mode de transmission

Les données expérimentales suggèrent que l'infection par le BDV s'opère par transmission horizontale. Un cas de transmission verticale a également été reporté (Hagiwara *et al.*, 2000). Cette observation a été confirmée ensuite expérimentalement chez la souris (Okamoto *et al.*, 2003). Cependant, même si le virus peut être détecté par PCR dans les sécrétions nasales, salivaires et les liquides conjonctifs des chevaux infectés, le mode de transmission naturelle du virus reste mal compris (Nowotny *et al.*, 2000).

Afin de préciser les mécanismes de transmission, la transmission virale entre des rats infectés à la naissance et des rats receveurs a été étudiée en détail (Sauder & Staeheli, 2003). Cette transmission a lieu uniquement lorsque les deux animaux sont en contact prolongé et ne peut s'opérer par le biais d'une cage souillée. Les rats infectés à la naissance ont en effet une charge virale très importante, qui apparaît progressivement dans la majorité des organes périphériques et des sécrétions. En particulier, l'urine de ces animaux est riche en virions. Chez les rats receveurs nouvellement infectés après contact, l'analyse par immunohistochimie révèle que le virus est initialement détecté dans l'organe voméronasal et dans le bulbe olfactif. La voie de transmission la plus probable s'effectue donc par l'épithélium olfactif. Les animaux infectés à la naissance pourraient de fait avoir un rôle central en tant que source permanente de virus.

Ces données relancent l'hypothèse des rongeurs comme vecteur ou réservoir du BDV (Dürwald & Ludwig, 1997; Rott & Becht, 1995; Sauder & Staeheli, 2003). En effet, ils sont très sensibles à l'infection, peuvent excréter du virus dans les urines et ils cohabitent souvent avec les animaux d'élevage. De plus, la maladie de Borna apparaît avec une incidence légèrement plus élevée au printemps et au début de l'été, des saisons caractérisées par une activité plus importante des petits

rongeurs. Dans une étude récemment publiée, des antigènes du BDV ont été détectés dans le cerveau de musaraignes (*Crocidura leucodon*) vivant dans les zones où la maladie de Borna est endémique chez les chevaux et les moutons (Monika Hilbe *et al.*, 2006). De façon intéressante, des antigènes du BDV ont aussi été détectés en périphérie chez ces animaux (Puorger *et al.*, 2010). De plus, la comparaison entre les séquences isolées de musaraigne et celles isolées d'un cheval récemment mort de la maladie de Borna aux alentours a montré plus de 99,9% d'homologie. Ces données suggèrent que cette espèce de musaraigne pourrait être une espèce réservoir du BDV.

Le BDV peut infecter un très grand nombre d'espèces animales, notamment des animaux domestiques qui sont en contact direct avec la population humaine. Ces résultats posent la question de l'infection humaine par le BDV et du potentiel zoonotique de ce virus.

3.3.3 Epidémiologie des infections humaines

De nombreux travaux réalisés chez le rat ont montré que l'infection par le BDV induisait des troubles comportementaux qui présentent certaines similitudes avec ceux observés chez certains patients souffrant de troubles psychiatriques, et plus particulièrement la schizophrénie. Des travaux initiaux ont révélé la présence d'anticorps anti-BDV spécifiquement chez des patients souffrant de troubles psychiatriques (Amsterdam *et al.*, 1985; Rott *et al.*, 1985). Ces travaux suggèrent donc que le BDV pourrait infecter l'homme et entraîner des troubles comportementaux, similaires à ceux décrits chez les rats infectés par le BDV à la naissance.

Les études suivantes, très controversées, n'ont pas permis de confirmer ces observations initiales. En effet, le BDV n'ayant été séquencé qu'en 1994, il n'y avait aucun moyen de vérifier la spécificité des séquences isolées. De plus, compte tenu de la difficulté d'interprétation des données de séroprévalence du BDV, l'implication du virus dans les pathologies psychiatriques humaines reste hypothétique. A l'heure

actuelle, il n'est toujours pas possible d'établir clairement un lien entre le BDV et une pathologie humaine. Cette impossibilité résulte notamment de l'absence de méthode diagnostique *intra vitam* fiable pour le BDV.

3.3.3.1 Mise en évidence d'infections humaines par le BDV

Certains laboratoires ont mis en évidence le virus sur des échantillons *post mortem* de cerveaux humains en isolant du virus, en détectant l'ARN viral par hybridation *in situ* ou encore en détectant les protéines virales par immunohistochimie.

Des souches de BDV ont été isolées à partir de cellules sanguines ou de cerveaux humains présentant des troubles psychiatriques (Bode *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 2000; Planz *et al.*, 1999). Le séquençage de ces isolats a cependant révélé que dans tous les cas, le virus isolé était identique à la souche virale utilisée en routine par le laboratoire ayant réussi l'isolement (Staeheli *et al.*, 2000), ce qui laisse suspecter une contamination probable de certains échantillons testés par des souches de laboratoire. Cette hypothèse ne peut être complètement écartée du fait de la conservation des séquences du BDV.

Deux études ont permis de détecter de l'ARN viral par hybridation *in situ* sur des coupes de cerveaux humains (de la Torre *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 2000). La protéine N du BDV a également été détectée par immunohistochimie sur ces mêmes cerveaux pour une de ces études (de la Torre *et al.*, 1996).

Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent bien que le BDV pourrait infecter l'homme, même si la possibilité de contamination de certains échantillons ne peut être exclue. Il ne faut cependant pas oublier que le BDV possède une très grande stabilité génomique. De plus, le large spectre d'hôte du BDV pourrait permettre à une même souche virale d'infecter à la fois l'homme et le cheval.

Groupe d'individus	Séroprévalence		Prévalence de l'ARN du BDV	
	Etudes positives/nombre total d'études	Médiane (répartition)	Etudes positives/nombre total d'études	Médiane (répartition)
Troubles psychiatriques non spécifiés	9/11	7% (0-30%)	6/7	11% (0-54%)
Schizophrénie	10/13	5% (0-45%)	5/13	0% (0-82%)
Dépression majeure	6/6	4% (1-12%)	1/8	0% (0-40%)
Troubles de l'humeur	3/4	6% (0-15%)	1/1	4% (4%)
Troubles liés à la consommation d'alcool ou de drogues	2/2	4% (2-5%)		
Retards mentaux	0/2	0% (0%)		
Troubles neurologiques variés	3/6	1 (0-5%)	1/2	1% (0-2%)
Démence	0/3	0 (0%)	0/1	0% (0%)
Maladie d'Alzheimer	1/1	1% (1%)	1/3	0% (0-11%)
Sclérose en plaques	1/3	5% (0-13%)	0/1	0% (0%)
Epilepsie	1/1	1% (1-1%)		
Maladie de Parkinson			1/2	8% (0-17%)
Tumeur cérébrale			1/1	14% (14%)
Syndrome de fatigue chronique	2/4	5% (0-34%)	3/4	12% (0-24%)
VIH/SIDA	8/8	11% (1-48%)		
EBV	2/3	1% (0-6%)		
Infections parasitaires	4/4	8% (5-19%)		
Personnel de santé	2/3	10% (0-46%)		
Autres groupes	9/13	7% (0-36%)	3/8	0% (0-7%)

Table 4: Résumé de la séroprévalence et de la prévalence en ARN du BDV chez l'homme

Etudes positives/nombre total d'études : correspond au nombre d'études qui ont réussies à détecter des marqueurs de l'infection par le BDV / nombre total d'études effectuées dans ce groupe d'individus

D'après Chalmers *et al.*, 2005.

3.3.3.1 BDV et pathologies humaines

De très nombreuses études épidémiologiques ont été réalisées en utilisant des mesures de séroprévalence ou de prévalence de l'ARN viral détecté par RT-PCR. Les résultats des études épidémiologiques publiées avant 2001 ont fait l'objet d'une méta-analyse en 2005, dont les résultats sont reportés dans le tableau 4 (Chalmers *et al.*, 2005).

Au vu de cette analyse, il apparaît tout d'abord que les résultats varient beaucoup d'une étude à l'autre. Ceci est vrai autant pour la détection des anticorps dirigés contre le BDV que de l'ARN viral détecté par PCR. La variabilité des résultats est aussi sans doute liée en grande partie à l'absence d'une méthode diagnostique standardisée entre les laboratoires.

Les études indiquent que des anticorps dirigés contre le virus ou de l'ARN viral sont présents dans de nombreux groupes de patients psychiatriques avec une prévalence de moins de 10%. Ils sont en revanche absents chez les patients souffrant de démence ou de retards mentaux. Il est intéressant de remarquer que des groupes de patients sélectionnés sur des critères non psychiatriques ont également des marqueurs de l'infection par le BDV. C'est le cas notamment de patients infectés par le HIV ou par des parasites.

A l'heure actuelle, le BDV ne peut donc pas être rigoureusement associé à une pathologie humaine en particulier. Une méthode diagnostique standardisée et fiable est nécessaire. Une autre difficulté est l'établissement de critères fiables de séropositivité. En effet, les sérums humains ne reconnaissent souvent qu'un des deux antigènes majeurs du BDV, contrairement à celui des animaux. Ceci pourrait être le reflet de caractéristiques de la réplication virale chez l'homme. Cela pourrait également indiquer que le virus détecté chez l'homme n'est pas le BDV, mais un virus proche. Cette hypothèse a été renforcée par le fait que les anticorps anti-BDV détectés chez l'homme sont de faible avidité (Allmang *et al.*, 2001).

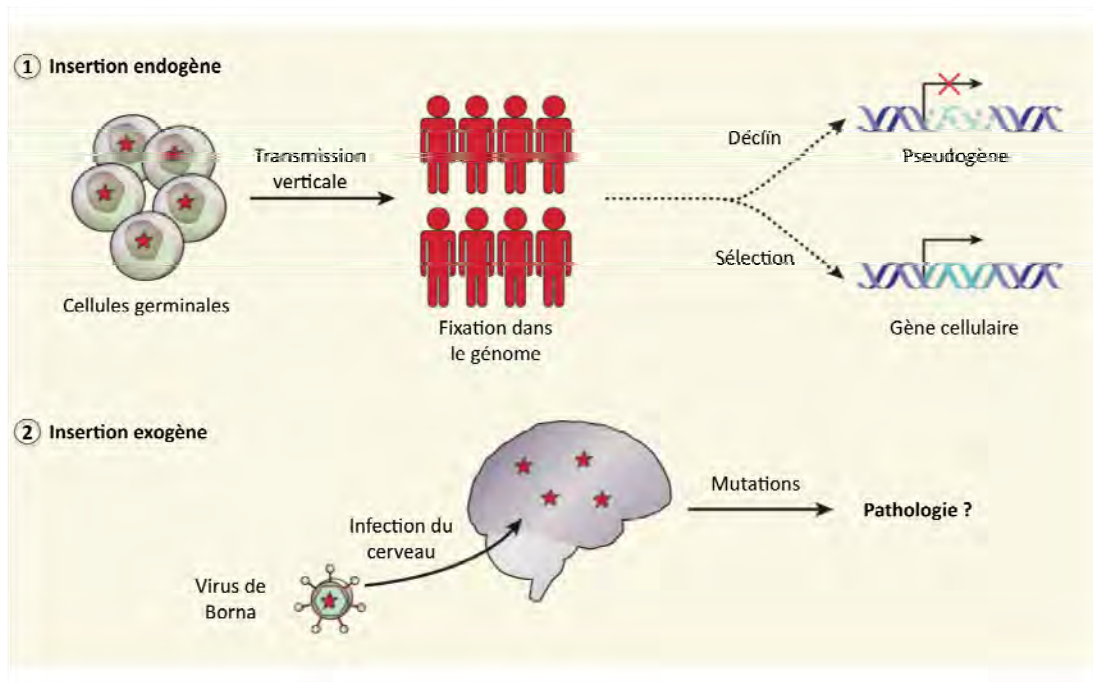


Figure 24: Le virus de Borna peut s'intégrer dans le génome humain

- ① Des séquences du génome du BDV (les étoiles rouges) se sont intégrées dans la lignée germinale de nos ancêtres par transmission verticale et se sont "fixées" dans le génome humain, devenant des séquences endogènes. Une insertion génétique suit alors deux voies possibles : soit elle est "dégradée" en pseudogène, soit elle est sélectionnée pour former un nouveau gène dont le produit a une fonction cellulaire.
- ② Les séquences du BDV peuvent s'intégrer dans le génome de cellules du cerveau après infection (insertion exogène). Ces séquences ne sont pas transmissibles mais pourraient provoquer des mutations qui interfèreraient avec les fonctions cérébrales et contribuer ainsi au développement de pathologies psychiatriques.

D'après Feschotte, 2010.

3.3.3.1 Le BDV, un virus endogène

Une étude récente a révélé l'existence de séquences homologues à celle de la nucléoprotéine N du BDV dans le génome de nombreux mammifères, dont l'homme (Horie *et al.*, 2010). L'analyse phylogénétique suggère une intégration dans le génome des primates il y a 40 millions d'années. De plus, ces séquences, appelées EBLN pour Endogenous Borna-Like N elements, contiennent une phase ouverte de lecture et peuvent donc être exprimées en termes d'ARNm. La sélection de ces séquences au cours de l'évolution implique qu'elles confèrent probablement un avantage sélectif, comme cela peut être le cas avec certains rétrovirus endogènes (Figure 24). Cette étude est la première prouvant l'endogénéisation de séquences non-rétrovirales dans des génomes de mammifère. Toutefois, le rôle potentiel de ces séquences reste à déterminer.

En conclusion, l'ensemble des études épidémiologiques indique que le BDV (ou un virus proche) est capable d'infecter l'homme. D'autres méthodes d'analyse devraient permettre de répondre à la question de l'implication éventuelle du BDV dans une pathologie humaine.

3.4 Physiopathologie de l'infection par le BDV

Les infections virales du SNC conduisent à des manifestations pathologiques variées. La persistance virale a des conséquences diverses en termes de latence et de signes cliniques. Si certains virus persistent de manière asymptomatique dans le SNC, ils peuvent induire des dysfonctionnements neuronaux. De plus, la persistance virale entraîne dans de nombreux cas l'induction d'une réponse immunitaire.

De la même façon, l'infection par le BDV peut revêtir des formes symptomatiques très variées. La maladie développée dépend de l'espèce, de l'âge et du statut immunitaire de l'hôte. Les signes cliniques peuvent être aussi influencés par la souche virale ou la voie d'entrée du virus. Nous avons vu précédemment qu'un grand nombre d'infections par le BDV passent vraisemblablement inaperçues, de par

Principales espèces infectées par le BDV

Cheval		
Forme aiguë	Phase précoce	modifications comportementales, dépression ou excitation troubles sensorimoteurs d'origine centrale
	Phase tardive	hyperkinésie, ataxie torticolis, poussé au mur paralysie et mort dans 80% des cas de paralysie
Forme chronique	si survie à la forme aiguë	persistance de modifications comportementales ou non
Forme asymptomatique		éventuellement légères modifications comportementales
Mouton		
Forme aiguë	Phase précoce	modifications comportementales troubles sensorimoteurs d'origine centrale
	Phase tardive	tremblements, ataxie, poussé au mur paralysie et mort ou chronicité
Forme asymptomatique		éventuellement légères modifications comportementales
Espèce occasionnellement infectée par le BDV		
Chat		
Modifications comportementales		anxiété, anorexie, hyperesthésie
Tremblements du chat ou « staggering disease »		tremblements, ataxie paralysie

Table 5 : Signes cliniques de la maladie de Borna chez les espèces animales infectées naturellement par le BDV

leur caractère asymptomatique. De ce fait, les cas diagnostiqués d'infection par le BDV chez les animaux correspondent à la forme la plus sévère de la maladie.

3.4.1 Infection naturelle

La première description de l'infection par le BDV date du XVIII^e siècle. Un traité de médecine vétérinaire allemand décrit alors une "maladie inflammatoire de la tête" (Von Sind, 1781). Les manifestations cliniques de la maladie de Borna sont très proches chez le cheval et le mouton, mais c'est le cheval que la maladie a été le plus précisément étudiée. Très peu de données sont encore disponibles pour les autres espèces naturellement infectées par le BDV car le diagnostic de l'infection par le BDV est souvent réalisé *post mortem*.

3.4.1.1 Signes cliniques

L'infection du cheval par le BDV peut conduire à des expressions cliniques très variées, allant d'une maladie aiguë à l'absence complète de signes cliniques (Table 5). Dans la forme aiguë, les signes cliniques initiaux consistent d'abord en troubles comportementaux (Richt & Rott, 2001). Les troubles nerveux s'aggravent ensuite rapidement et conduisent soit à une hyperexcitabilité associée à l'agressivité et l'hyperactivité motrice (syndrome en "hyper"), soit au contraire à la léthargie (syndrome en "hypo"). Les chevaux sont souvent ataxiques et une paralysie totale est parfois observée. L'issue est fatale dans 80% des cas et les chevaux succombent entre une et 4 semaines après la survenue des premiers signes cliniques (Dürwald & Ludwig, 1997). En revanche, si l'animal survit à la phase aiguë de la maladie, il se produit un passage à l'état chronique. La maladie chronique consiste en une dépression associée à une apathie, de la somnolence et à un comportement craintif. Ces troubles comportementaux persistent alors tout au long de la vie de l'animal.

Il est intéressant de souligner que du virus infectieux peut être isolé à partir des animaux, même en phase chronique de la maladie, ce qui indique la persistance de l'infection par le BDV. Les signes cliniques observés en phase chronique ne sont

donc sans doute pas uniquement dus aux séquelles de la réponse immunitaire lors de la phase aiguë mais aussi au virus lui-même.

3.4.1.2 Lésions histopathologiques

L'infection des chevaux par le BDV conduit à des lésions qui s'étendent au niveau du SNC et évoluent au cours de la maladie. Le cerveau, la moelle épinière et la rétine sont principalement touchés. Les lésions en phase aiguë sont caractéristiques d'une méningo-encéphalite non suppurée avec une infiltration de cellules mononucléées au niveau cérébral : macrophages, LT et quelques LB et cellules plasmacytoïdes sont détectées (Pletnikov *et al.*, 2002). Une astrocytose réactionnelle se développe également au niveau des régions atteintes par l'inflammation.

3.4.2 Modèles animaux expérimentaux

Les modèles expérimentaux offrent des outils de simplification pour décrire les mécanismes physiopathologiques mis en jeu lors de l'infection par le BDV. Certains sont néanmoins proches des cas d'infection naturelle. L'infection du rat par le BDV présente une symptomatologie variée et très similaire à celle rencontrée dans l'infection naturelle du cheval.

3.4.2.1 Infection expérimentale du rat

L'infection du rat est très couramment utilisée pour étudier les mécanismes physiopathologiques engagés au cours de l'infection. Le rat est une espèce assez susceptible à l'infection par le BDV. Cependant, toutes les lignées de rats ne présentent pas la même sensibilité à l'infection (Pletnikov *et al.*, 2002). Les rats de la souche Lewis présentent une plus grande susceptibilité à l'infection par le BDV et elle est la plus utilisée en laboratoire. Le type de syndrome observé chez le rat Lewis

infecté dépend en grande partie des conditions expérimentales de l'infection. En effet, chez le rat deux maladies ont été définies :

- L'infection du rat jeune ou adulte immunocompétent, une maladie médiée par le système immunitaire caractérisée par des désordres importants de la locomotion et du comportement (Solbrig *et al.*, 1994; Solbrig *et al.*, 1995; Solbrig *et al.*, 1996);
- L'infection du rat nouveau-né, une maladie distincte caractérisée par une dysgénésie cérébelleuse et de l'hippocampe, une hyperactivité, des difficultés d'apprentissage (Bautista *et al.*, 1994; Hornig *et al.*, 1999; Rubin *et al.*, 1999) et une réaction immunitaire transitoire (Hornig *et al.*, 1999; Sauder & de la Torre, 1999).

La distribution virale est la même quelque soit l'âge d'infection et le virus n'induit pas directement de mort des cellules du SNC. L'issue de la maladie est liée au niveau de développement des systèmes nerveux et immunitaire au moment de l'infection. Ainsi, la pathologie observée chez le rat adulte présente des caractéristiques très similaires à celles rencontrées lors de l'infection naturelle du cheval, c'est-à-dire une maladie de Borna dite "classique". En revanche, l'infection de rats nouveaux-nés entraîne l'émergence d'une maladie neurodéveloppementale associée à des troubles du comportement.

3.4.2.1.1 Infection du rat Lewis adulte

Cinétique d'infection et dissémination du BDV

La cinétique d'apparition des signes cliniques dépend fortement de la voie d'inoculation du BDV. Généralement, les premiers signes cliniques sont détectés après une dizaine de jours lorsque l'inoculation est effectuée par voie intracérébrale. L'instillation nasale d'une suspension virale entraîne l'apparition des premiers signes cliniques après 20-24 jours. Enfin, l'infection par le virus au niveau du coussinet

plantaire mettra 47 jours en moyenne à se déclarer sur le plan clinique (Richt *et al.*, 1992). Le délai variable d'apparition des signes cliniques entre ces différentes voies reflète le temps nécessaire au BDV pour parvenir jusqu'au SNC et s'y répliquer. Ces données illustrent la capacité de transport rétrograde du virus depuis la périphérie, sans doute par l'emprunt des voies nerveuses sensitives et sensorielles de l'animal (Morales *et al.*, 1988).

La voie intranasale d'inoculation du BDV correspond le plus probablement à la voie d'entrée naturelle du virus. Elle a été très utilisée pour déterminer le trajet qu'utilise le BDV pour atteindre le SNC. Après inoculation, le virus se réplique d'abord au sein des cellules neuroréceptrices de l'épithélium olfactif. Il se propage ensuite dans toutes les zones du cerveau en empruntant les connexions intersynaptiques (Gonzalez–Dunia, 1997). Il présente un tropisme préférentiel pour le système limbique et en particulier pour l'hippocampe et le cortex qui présentent les charges virales les plus conséquentes. Le thalamus et l'hypothalamus sont également infectés. Lors des stades tardifs, le virus peut être détecté dans la moelle épinière et les neurones du système nerveux périphérique.

Au niveau cellulaire, les protéines du BDV sont essentiellement détectées dans le noyau et le corps cellulaire des neurones, mais aussi au niveau des prolongements neuronaux (de la Torre, 2002; Pletnikov & Gonzalez–Dunia, 2002). Le virus peut également infecter secondairement les astrocyte, les oligodendrocytes, les cellules épendymaires et les cellules de Schwann (de la Torre, 2002).

Signes cliniques de l'infection

L'infection du rat adulte immunocompétent s'exprime cliniquement en deux phases caractérisées toutes deux par des signes neurologiques sévères, semblables à ceux des chevaux souffrant de la maladie de Borna "classique" (Carbone *et al.*, 1991). Au cours d'une première phase dite aiguë, les signes cliniques apparaissent 10 à 20 jours après l'inoculation intracrânienne, ce qui coïncide avec l'induction d'une réaction inflammatoire du SNC. Les rats deviennent d'abord hyperactifs, voire agressifs. Ils présentent des réponses exagérées aux stimuli environnants. Des troubles de la coordination motrice ainsi qu'une désorientation peuvent également apparaître. Ensuite, ils présentent une agitation constante de la

tête, un rétrocolis et une parésie intense. Une forte réaction inflammatoire, en particulier au niveau du système limbique, du cortex et du bulbe olfactif s'accompagne d'une destruction neuronale (Pletnikov & Gonzalez–Dunia, 2002). Il n'est pas rare de détecter à ce stade une rétinite intense (Stahl *et al.*, 2003). Les animaux maigrissent beaucoup. Plus cette phase est intense et durable, plus une proportion importante du tissu nerveux est détruite par la réponse immunitaire.

Les rats survivent à cette phase aiguë dans 40 à 70% des cas. Ils entrent alors dans la phase chronique de la maladie. Celle-ci apparaît généralement après 50 jours post-infection intracérébrale. Elle se caractérise par de l'apathie, de la somnolence et de la dépression.

Le passage de la phase aiguë à la phase chronique a lieu progressivement, avec la régression progressive de la réaction inflammatoire, malgré une réplication virale qui demeure soutenue. Les mécanismes impliqués dans la régression spontanée de l'inflammation ne sont pas connus mais pourrait être la conséquence d'un phénomène d'épuisement du système immunitaire, similaire à celui décrit pour l'infection par LCMV.

Mécanismes immunopathologiques

L'analyse histologique des cerveaux de rats infectés par le BDV révèle la présence de nombreuses cellules mononucléées dans les infiltrats. Ce sont essentiellement des LT CD4 et CD8 ainsi que des macrophages (Pletnikov & Gonzalez–Dunia, 2002). Les LT CD8, majoritaires, se localisent autour des lésions. Les LT CD4 sont présents plutôt autour des vaisseaux sanguins sans localisation plus spécifique. Ces données suggèrent que les CTL sont les principaux effecteurs de la destruction neuronale lors de l'infection des rats adultes (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1997). Pendant longtemps les contributions relatives de ces différents effecteurs à la pathologie sont restées ignorées. Des expériences de déplétion des LT ont permis de mettre en évidence l'importance de la réponse immunitaire spécifique dans l'induction de l'encéphalite par le BDV. En effet, les rats adultes immunodéprimés ou thymectomisés ne développent aucune maladie aiguë après l'infection (Herzog *et al.*, 1985). L'élimination ou la suppression des fonctions effectrices des LT CD8 et CD4 bloque le développement des signes cliniques et des lésions histopathologiques dans

le SNC. La réponse immune spécifique joue un rôle essentiel dans la physiopathologie de la méningo-encéphalite due au BDV (de la Torre, 2002).

Par la suite, le rôle prépondérant des LT CD8 dans la pathologie a été démontré. Les LT CD8 isolés directement à partir de cerveaux de rats malades ont pu être utilisés pour effectuer des expériences de transfert adoptif (Sobbe *et al.*, 1997). Transférés à des rats infectés immunodéprimés (donc n'ayant pas développé de méningo-encéphalite), ces LT CD8 engendrent l'apparition de lésions dans le SNC. La destruction neuronale est corrélée à la présence d'ARNm de la perforine, molécule cytotoxique sécrétée par les LT CD8. Les LT CD4 semblent avoir une fonction classique d'aide au recrutement des LT CD8 et à la promotion de leur fonction effectrice (Nöske *et al.*, 1998).

Par ailleurs, la présentation d'épitopes viraux à la surface des cellules infectées n'était pas connue chez le rat jusqu'à récemment. Des études ont permis d'identifier le premier épitope immunodominant naturellement généré chez le rat dans le cadre de l'infection par le BDV (Planz *et al.*, 2001). Cet épitope, le peptide ASYAQMTTY, est dérivé de la protéine N du virus. *In vitro*, des tests de cytotoxicité menés avec des lymphocytes isolés des cerveaux de rats en phase clinique de la maladie de Borna, mis en contact avec des cellules cibles non neuronales chargées préalablement avec le peptide ou infectées par le BDV, montrent la lyse spécifique de ces cellules. En revanche, l'expression d'un tel peptide à la surface des neurones par le CMH-I n'a pas été démontrée.

En outre, le profil cytokinique des cerveaux de rats en phase clinique de l'infection par le BDV montre l'expression de cytokines proinflammatoires (Gonzalez-Dunia, 1997). Certaines cytokines révèlent l'activation de la microglie. C'est le cas du peptide activateur des cellules endothéliales et monocytes de type II (EMAP-II), dont l'expression est 30 fois plus intense dans les cerveaux des rats en phase clinique de la maladie de Borna (Mueller *et al.*, 2003). Ces cytokines peuvent être toxiques pour les neurones et contribuent sans doute à l'immunopathologie associée à l'infection par le BDV.

L'immunopathologie de l'infection du rat Lewis adulte par le BDV est donc essentiellement médiée par les LT CD8. En détruisant les neurones, particulièrement des circuits dopaminergiques et cholinergiques de l'hippocampe (Gies *et al.*, 2001; Stitz *et al.*, 2002), les LT CD8 recrutent les LT CD4 amplificateurs de la réponse immunitaire et produisent des cytokines aggravant ainsi l'inflammation.

Certaines altérations comportementales sont observées au cours de l'infection par le BDV du rat Lewis adulte. Des altérations du système dopaminergique sont alors constatées mais il est difficile de faire la part des choses entre les conséquences directes de l'infection par le BDV et les conséquences de l'inflammation.

3.4.2.1.2 Infection néonatale du rat Lewis et troubles du comportement

Dissémination dans le SNC

L'infection périnatale du rat Lewis n'entraîne pas d'inflammation du SNC et conduit à des troubles du comportement. A l'aide de ce modèle, il est donc possible d'étudier certains mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces troubles. L'infection expérimentale du rat Lewis nouveau-né est effectuée en général par voie intracérébrale dans les premières 24 heures de vie. Dix jours après l'infection, le BDV est détecté au niveau des différentes zones du système limbique. En particulier, les protéines virales sont détectées en grande quantité au niveau de l'hippocampe, du cortex et du cervelet (Bautista *et al.*, 1994; Gonzalez-Dunia *et al.*, 2000). Trois semaines après l'infection, le virus est présent dans tout le SNC. Il est détecté au niveau des prolongements neuritiques des neurones du système limbique et infecte les cellules gliales.

Malgré une charge virale importante à ce stade, aucun anticorps neutralisant dirigé contre le virus n'est détectable en sérologie, ce qui peut expliquer que celui-ci se dissémine plus facilement dans l'organisme de l'animal atteint (Stitz *et al.*, 1998). Dans ce contexte, l'infection peut se propager rapidement au niveau du SNC puis, dans les stades plus tardifs, elle diffuse au niveau du SNP et dans tous les tissus innervés. Cela peut expliquer aussi que le BDV soit retrouvé en quantité

notable dans les urines des rats infectés à la naissance (Sauder & Staeheli, 2003). Malgré la réplication active du virus dans les neurones, les animaux n'en meurent pas et l'infection persiste tout au long de la vie de l'animal.

Altérations neurodéveloppementales

L'infection néonatale du rat Lewis conduit à un retard de croissance caractérisé par une perte de poids, malgré des niveaux d'expression normaux des hormones de croissance (Bautista *et al.*, 1994).

L'infection néonatale par le BDV perturbe en particulier la formation des structures présentant un développement postnatal considérable. C'est le cas du système limbique qui subit des phénomènes de remaniement extrêmement importants au cours des 15 premiers jours de vie de l'animal (Gonzalez-Dunia *et al.*, 2005). Cette différenciation postnatale concerne en particulier l'hippocampe et le gyrus denté. Au moment de la naissance, seulement 15% des neurones ont été générés dans ces zones (Bayer, 1980), et la neurogénèse des cellules granulaires continuerait tout au long de la vie de l'animal (Song *et al.*, 2002). Au cours de l'infection, la dégénérescence des neurones granulaires du gyrus denté a lieu progressivement et est complète à 35 jours post-infection (Carbone *et al.*, 2001). Ceci a été confirmé lors de l'infection par le BDV de cultures organotypiques d'hippocampe de rat (Mayer *et al.*, 2005).

La perte neuronale ne correspond pas un défaut de neurogénèse ou à une sensibilité accrue des neurones nouvellement générés à l'infection, mais bien à la perte sélective des neurones déjà matures, c'est-à-dire ayant déjà développé une arborisation axonale et dendritique. Les marquages immunocytochimiques révèlent un marquage des neurones immatures par Prox1 (un facteur de transcription exprimé spécifiquement par les neurones immatures) inchangé, une diminution de nombre de boutons synaptiques au niveau des fibres myélinisées, sans doute consécutive à une rétraction axonale.

L'infection concerne également les neurones pyramidaux au sein des régions CA3 et CA4 de la corne d'Ammon de l'hippocampe. Malgré l'importante réplication du virus dans cette zone, aucune destruction de la corne d'Ammon n'est

observée. Les mécanismes moléculaires à l'origine de cette mort sélective des neurones matures au sein d'une région subissant une neurogénèse importante demeurent inconnus. Le BDV altère visiblement la fonction neuronale de ces cellules (Mayer *et al.*, 2005).

Le cervelet fait également l'objet d'un développement postnatal important puisque sa taille est multipliée par 20 dans les 30 premiers jours après la naissance. L'infection par le BDV intervient également dans cette fenêtre de développement et affecte la structure du cervelet. Le BDV engendre la perte de l'arborisation foliacée puis la mort des cellules de Purkinje (Bautista *et al.*, 1995). Ceci se traduit par une hypoplasie cérébelleuse constatée à l'échelle macroscopique. Il est intéressant de remarquer que la vulnérabilité des neurones de Purkinje dépend de l'âge auquel l'animal est infecté. En effet, si l'infection intervient vers le quinzième jour postnatal, le BDV infecte aussi massivement le cervelet mais sans induire l'hypoplasie cérébelleuse engendrée lors d'infections plus précoces.

Des atteintes cérébelleuses sont également constatées lors d'infections par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), le réovirus de type III ou les parvovirus. Cependant, dans tous ces cas, l'infection est lytique, conduisant à la destruction des cellules granulaires cérébelleuses et non des cellules de Purkinje, entraînant des signes cliniques majoritairement marqués par une ataxie. Les mécanismes de l'hypoplasie cérébelleuse induite par le BDV, qui est un virus non cytolitique, sont mal compris.

À des stades tardifs de l'infection néonatale par le BDV, une atrophie du cortex est constatée (Gonzalez-Dunia *et al.*, 2000; Pletnikov *et al.*, 2002). Elle est associée à une diminution du niveau d'expression de marqueurs de neuroplasticité tels que GAP-43 et de la synaptophysine. Après 45 jours d'infection, l'analyse morphométrique révèle une perte de 30% des neurones corticaux (Gonzalez-Dunia *et al.*, 2000).

Astrocytose et gliose réactionnelle

L'infection néonatale par le BDV n'induit pas de réponse immunitaire spécifique responsable d'encéphalite. En revanche, la mort des neurones dans certaines régions induit l'activation des astrocytes et de la microglie. Dans les régions infectées non concernées par l'apoptose, l'astrocytose pourrait être liée à l'infection tardive des cellules gliales par le BDV, ce qui entretiendrait un état d'activation gliale (Pletnikov & Gonzalez–Dunia, 2002).

L'astrocytose est caractérisée par une augmentation du nombre et de la taille de astrocytes exprimant la protéine GFAP (Glial Fibrillar Acidic Protein). L'intensité du marquage de la GFAP augmente dès le 3^e jour suivant l'infection par le BDV (Bautista *et al.*, 1995). Cette expression s'accroît continuellement au cours de l'infection et atteint surtout les zones où la perte neuronale est importante, c'est-à-dire le gyrus denté, le cervelet et le cortex (Bautista *et al.*, 1995; Pletnikov & Gonzalez–Dunia, 2002). La microgliose est aussi intense comme le révèle l'expression de marqueurs comme ED-1 (Sauder & de la Torre, 1999). La première conséquence de l'astrocytose et de la microgliose réactionnelles est la production locale de facteurs potentiellement toxiques pour les neurones.

Certaines cytokines sont d'importants médiateurs de mort neuronale et promeuvent les mécanismes excitotoxiques (Nguyen *et al.*, 2002). Les rats infectés à la naissance expriment des niveaux élevés de cytokines proinflammatoires telles que l'IL-6, le TNF- α , l'IL-1 α et l'IL-1 β au niveau de l'hippocampe et du cervelet (Sauder & de la Torre, 1999; Weissenböck *et al.*, 2000). Les chimiokines RANTES et IP-10 ont également des niveaux d'expression augmentés. En outre, les cytokines proinflammatoires peuvent interférer directement avec les phénomènes de potentialisation à long terme (Li *et al.*, 1997; Lynch, 2004).

Cependant, certaines chimiokines pourraient aussi favoriser la survie et le développement neuronal et avoir un effet neuroprotecteur en aidant les cellules à lutter contre le stress oxydatif. C'est le cas par exemple du facteur tissulaire (TF), dont l'expression est augmentée lors d'infection par le BDV dans le cerveau des rats infectés. Le TF active la cascade de coagulation jusqu'à l'activation de la thrombine qui joue un rôle important dans le développement du SNC, la plasticité neuronale et

la régulation de la croissance des neurites (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1996). Le cas du facteur S100 β est également intéressant à citer. Ce facteur dérivé des astrocytes stimule la survie, la prolifération et la différenciation neuronale. Mais il est également impliqué dans la réponse inflammatoire qu'il favorise en liant le récepteur des produits terminaux de glycation avancée (RAGE). La diminution du niveau d'expression de S100 β et de RAGE au niveau du cerveau d'animaux infectés par le BDV pourrait constituer un mécanisme de désensibilisation des astrocytes aux cytokines proinflammatoires et favoriser ainsi un état inflammatoire modéré permettant la persistance virale (Ohtaki *et al.*, 2007).

Troubles du comportement

Les animaux infectés à la naissance par le BDV présentent des signes cliniques comportementaux et sensori-moteurs. Certains sont liés à une altération du fonctionnement neuronal, suggérant l'interférence plus ou moins directe du virus avec la physiologie du neurone. D'autres résultent plus ou moins directement de l'interférence du virus avec le développement postnatal du cerveau.

L'atteinte du cervelet et de sa maturation postnatale, conduit à l'apparition de troubles locomoteurs. Ces derniers sont à relier à l'évolution de la maladie et à la sévérité des lésions (Pletnikov *et al.*, 2000). En l'absence d'atteinte des granules cérébelleux, les rats ne présentent pas d'ataxie majeure (Rubin *et al.*, 1999). Au cours du temps, une spasticité modérée des membres postérieurs conduit à l'incapacité des rats à se suspendre sur les grilles des cages (Hornig *et al.*, 1999). Les déficits locomoteurs apparaissent ainsi à 2 semaines post-infection. Après 3 semaines, les rats présentent des défauts de posture liés à la perte de la proprioception et à l'atteinte cérébelleuse, ainsi qu'un défaut du réflexe de préhension (Pletnikov *et al.*, 2001).

Les altérations neurodéveloppementales qui touchent l'hippocampe conduisent également à des troubles du comportement. L'hippocampe étant une aire cérébrale fonctionnelle essentielle à l'apprentissage et à la mémoire, son atteinte entraîne des déficits cognitifs et de reconnaissance spatiale. Ainsi, les rats présentent des troubles de la mémoire spatiale alors que leur attitude d'exploration n'est pas altérée. Ils présentent une altération des réponses à des tests d'exploration

en labyrinthe (Rubin *et al.*, 1999). En outre, les mécanismes de mémoire associative des rats infectés à la naissance font défaut, comme le montre la réponse des rats à des tests de conditionnement par stimulus aversif. La mémoire associative est un bon marqueur de l'intégrité du système limbique, puisqu'elle repose sur le fonctionnement de l'amygdale et de l'hippocampe. Les rats infectés à la naissance par le BDV ont un défaut d'apprentissage des stimuli ce qui conduit à l'absence de réponse associative et seulement à un comportement "d'appoint" par rapport au stimulus instantané (Pletnikov *et al.*, 1999). Les rats font partie d'une espèce possédant un haut degré d'organisation sociale et hiérarchique. Les rats infectés manifestent des défauts concernant les comportements d'interaction sociale et de jeu.

Enfin, les rats infectés néonatalement par le BDV présentent d'autres altérations du comportement comme l'hyperactivité, des déficits cognitifs ou de l'anxiété chronique (Pletnikov *et al.*, 2002). Ces troubles sont difficiles à relier à une altération neurodéveloppementale particulière et semblent résulter de dysrégulation du fonctionnement neuronal.

3.4.2.2 Infection expérimentale de la souris

3.4.2.2.1 Adaptation du BDV et réceptivité des souches murines

La souris est une espèce naturellement résistante à l'infection par le BDV (Kao *et al.*, 1984). Néanmoins, il a été possible d'adapter certaines souches virales à des lignées murines afin qu'elles deviennent susceptibles à l'infection par le BDV.

Cette adaptation n'est réalisable que sur des lignées murines porteuses d'un allèle particulier du gène du CMH-I, H-2^K, notamment les souches B10.BR et MRL. Ces souris doivent être infectées dans les 16 à 24 heures suivant leur naissance. Au delà, la susceptibilité est nulle.

L'adaptation du BDV à ces souches de souris nécessite au moins 4 passages du virus sauvage dans le cerveau des souris. Les souris infectées développent alors une méningo-encéphalite sévère et létale dans la période postnatale

(Hallensleben *et al.*, 1998). Par ailleurs, on peut rendre certaines souches réceptives à l'infection, comme les C57Bl/6, par délétion de leur gène codant pour les récepteurs à l'IFN de type I (IFNAR1). Les souris transgéniques IFNAR1^{-/-} ne développent aucun signe clinique, malgré une réplication efficace du virus au sein du SNC.

Ces dernières années, le modèle murin a permis de dégager certaines grandes caractéristiques immunopathologiques de la maladie de Borna.

3.4.2.2.2 La méningo-encéphalite liée à BDV dans le modèle murin

Signes cliniques

La pathologie développée dans le modèle murin résultant de l'infection par le BDV est assez différente de celle rencontrée dans le contexte de l'infection de l'hôte naturel ou du rat. D'abord, l'infection est mortelle dans 100% des cas (Hallensleben *et al.*, 1998).

Après injection intracérébrale du BDV, les souris de souche susceptible développent des signes neurologiques après 4 à 6 semaines. Elles présentent d'abord des troubles de la posture et une parésie des membres postérieurs. Ensuite, les animaux restent prostrés, ont une fourrure hirsute, des réflexes anormaux et cessent de s'alimenter.

Lésions

D'un point de vue histopathologique, les souris présentent des lésions de méningo-encéphalite à médiation immune accompagnée de l'infiltration de LT CD8. Ceci est associé à une perte de la densité neuronale, alors qu'aucune astrocytose n'est observée.

3.4.2.2.3 Mécanismes immunopathologiques

Le recrutement des lymphocytes dans le SNC pourrait faire appel à des chimiokines comme CCL5 et CXCL10, dont l'expression est augmentée au niveau du SNC d'animaux infectés par le BDV (Friedl *et al.*, 2004).

La contribution de la réponse T CD8 a été bien documentée. En effet, des souris de fond génétique MLR délétées du gène de la β 2-microglobuline ne développent plus de signes neurologiques (Hallensleben *et al.*, 1998). Ces souris ne peuvent plus produire de CTL et il n'y a plus d'infiltrats au niveau du cortex après infection. La composante T CD8 de la réponse immunitaire spécifique semble donc essentielle dans l'émergence de l'encéphalite causée par le BDV.

Un épitope immunodominant issu de la nucléoprotéine N du BDV a été mis en évidence. Il s'agit du peptide TELEISSI (Schamel *et al.*, 2001). Cet épitope est essentiel à la pathologie bien qu'il existe d'autres épitopes viraux. Avec la maîtrise de la génétique inverse, il a été possible de générer un virus recombinant muté dans la séquence du peptide N (TQLEISSI). Les souris infectées avec ce virus développent une méningo-encéphalite après transfert adoptif de LT CD8 issus de cerveaux d'autres souris infectées par la souche virale sauvage He/80 (Richter *et al.*, 2007). Les signes cliniques induits sont néanmoins retardés, ce qui souligne la prépondérance de l'épitope immunodominant dans l'induction de la maladie.

Le modèle murin permet également l'analyse des effecteurs de la réponse immunitaire. La réponse effectrice est indépendante de la reconnaissance Fas/FasL mais dépendante du système perforine (Hausmann *et al.*, 2005). L'IL-12 joue un rôle important dans le recrutement local des CTL. L'IFN- γ est aussi produit au niveau des infiltrats et jouerait un rôle important dans la pathologie liée à l'infection par le BDV des souris (Hausmann *et al.*, 2005).

Le modèle murin d'infection par le BDV est donc très intéressant, mais il reste assez éloigné de la pathologie rencontrée lors d'infections naturelles par le virus. Il a néanmoins permis d'analyser précisément certains mécanismes immunopathologiques mis en jeu par les effecteurs de la réponse immunitaire antivirale, tout au moins dans ce modèle particulier.

Enfin, des souris transgéniques déficientes pour la réponse T CD8 infectées par le BDV développent des troubles du comportement discrets, comme des défauts de mémoire spatiale (Sauder *et al.*, 2001). Ces troubles pourraient être liés à un effet direct du BDV sur la fonction neuronale.

Les modèles animaux d'infection du SNC par le BDV permettent donc d'analyser de multiples aspects physiopathologiques de l'infection. Le modèle d'infection du rat Lewis nouveau-né, bien que complexe, a permis de suggérer que le BDV pourrait interférer spécifiquement avec la régulation du fonctionnement neuronal. Cependant, sa nature évolutive limite les possibilités d'étude. En effet, la pathologie dans ce modèle résulte de nombreuses composantes, incluant les effets directs du virus, les conséquences des atteintes neurodéveloppementales (mort neuronale notamment) ou la réaction de la glie. Pour caractériser les effets directs du virus sur le fonctionnement neuronal, il est donc nécessaire de limiter la superposition de ces facteurs. Ceci a conduit diverses équipes à modéliser l'infection par le BDV dans des modèles simplifiés, incluant des cultures organotypiques de structures cérébrales, des lignées cellulaires ou des cultures primaires de neurones (Gonzalez-Dunia *et al.*, 2005).

Nous nous sommes particulièrement intéressé dans notre équipe à l'interférence de protéines du BDV avec le fonctionnement neuronal. Nous avons ainsi montré que la phosphoprotéine sert de substrat leurre de la PKC neuronal, interférant avec ces cibles cellulaires et supprimant la potentialisation à long terme des neurones infectés (Volmer *et al.*, 2006; Volmer *et al.*, 2007; Prat *et al.*, 2009).

OBJECTIFS

1. Les neurones, une cible pour les lymphocytes T CD8 dans les pathologies neurologiques ?

Je me suis attaché durant ma thèse à l'analyse des interactions entre LT CD8 et neurones. Les neurones, comme décrit précédemment, sont partiellement protégés de la reconnaissance par le système immunitaire de par l'absence d'expression de molécules du CMH-I en conditions physiologiques. L'attaque présumée des neurones par les LT CD8 est donc encore sujette à controverse.

Toutefois, l'importance des LT CD8 a récemment émergé dans diverses pathologies neuroinflammatoires d'origine infectieuse, autoimmune ou paranéoplasique. Les LT CD8 sont également suspectés d'intervenir dans la physiopathologie de maladies neurodégénératives. Parmi les maladies neuroinflammatoires dans lesquelles les LT CD8 ont été incriminés, on peut citer la sclérose en plaques (SEP), les encéphalites virales, la leucoencéphalopathie multifocale progressive, l'encéphalite de Rasmussen, la dégénérescence cérébelleuse paranéoplasique et l'adrénoleucodystrophie liée à l'X (Neumann *et al.*, 2002). De même, pour les maladies neurodégénératives, citons la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer. Dans tous ces exemples, on présume que les LT CD8 ciblent les neurones, que ce soit de manière directe ou indirecte suite à la destruction de la gaine de myéline et des oligodendrocytes.

Je ne décrirai ici que les données expérimentales concernant la SEP, une maladie neuroinflammatoire pour laquelle nous avons beaucoup d'arguments en faveur d'un rôle des LT CD8. Dans les lésions aiguës ou chroniques de la substance blanche, les LT CD8 sont beaucoup plus nombreux que les LT CD4, les surpassant en nombre 5 à 10 fois (Henderson *et al.*, 2009). De plus, les LT CD8 sont principalement retrouvés dans le parenchyme cérébral, alors que les LT CD4 sont souvent restreints à l'espace périvasculaire (Booss *et al.*, 1983; Hauser *et al.*, 1986). Une expansion oligoclonale des LT CD8 est également observée dans le SNC et le LCR (Junker *et al.*, 2007). Enfin, les lésions axonales de la substance blanche sont corrélées avec le

nombre de LT CD8 infiltrants (Bitsch *et al.*, 2000; Kuhlmann *et al.*, 2002) et l'activation de la microglie (Ferguson *et al.*, 1997; Trapp *et al.*, 1998).

Les lésions de la substance grise dans la SEP sont caractérisées par moins d'infiltrats de LT (Peterson *et al.*, 2001). Néanmoins, les lésions de la substance grise montrent une prépondérance de LT CD8. Au niveau des lésions, la démyélinisation est accompagnée de transections axonales, d'une diminution de la densité synaptique, ainsi que de changements au niveau du corps neuronal (Peterson *et al.*, 2001; Stadelmann *et al.*, 2008)

Avec l'observation récente que les neurones ainsi que toutes les cellules résidentes du SNC peuvent exprimer les molécules du CMH-I au niveau des lésions inflammatoires (Höftberger *et al.*, 2004), ces données suggèrent que les LT CD8 peuvent contribuer aux dommages de la substance blanche au niveau des oligodendrocytes, mais aussi des axones.

2. Problématique : mise en évidence d'un rôle cytotoxique des lymphocytes T CD8 vis-à-vis des neurones *in vitro*

Ces données cliniques suggèrent fortement un rôle directement cytolytique des LT CD8 vis à vis des neurones. Toutefois, jusqu'à aujourd'hui les seules preuves formelles d'une destruction neuronale par les LT CD8 ont été apportées par des modèles *in vitro*.

Dans ces travaux, l'expression de molécules du CMH-I par les neurones avait été induite artificiellement, après traitement par l'IFN- γ et la TTX (Medana *et al.*, 2000; Melzer *et al.*, 2009). Les neurones ainsi traités étaient ensuite chargés en peptides exogènes. Enfin, les populations lymphocytaires utilisées sont des clones de lymphocytes T cytotoxiques restimulés *in vitro*. Les données obtenues à l'aide de modèles transgéniques permettant l'expression d'un antigène modèle par les neurones du SNC utilisent de la même façon des clones de lymphocytes T cytotoxiques (Rall *et al.*, 1995).

Ces études ont renforcé l'hypothèse d'une probable reconnaissance neuronale par les LT CD8 dans le cadre d'une neuroinflammation (c'est-à-dire quand les neurones peuvent exprimer du CMH-I) et ont permis d'apporter certains éléments de compréhension quant aux mécanismes mis en jeu. Néanmoins, ces systèmes sont éloignés de la physiopathologie, notamment eu égard à l'expression de complexes CMH-I/peptide qui pourrait être exacerbée par le traitement à l'IFN- γ et à la TTX. De même, l'emploi de LT CD8 issus de lignées transgéniques, stimulés à plusieurs reprises *in vitro*, ne représente sans doute pas le statut d'activation d'un LT CD8 infiltrant le SNC.

3. Modèle d'étude de ma thèse

Il était donc important de déterminer la capacité de LT CD8 générés lors d'une maladie naturelle à reconnaître un épitope étranger présenté naturellement par les neurones. L'objectif de ma thèse était ainsi d'évaluer si les neurones peuvent apprêter et présenter un antigène "naturel", en l'occurrence viral, et être reconnus par des lymphocytes T cytotoxiques générés naturellement.

Le BDV offre un modèle de choix puisqu'il est non cytolytique, permettant l'infection de cultures neuronales *in vitro*. D'autre part, comme décrit dans l'introduction, la neuroinflammation induite par l'infection chez le rat adulte est principalement médiée par les LT CD8.

Récemment, dans le modèle du BDV, il a été montré que le transfert de clones de LT CD8 à des souris transgéniques exprimant la nucléoprotéine N du virus au niveau des neurones ou des astrocytes déclenchait des troubles neuroinflammatoires (Baur *et al.*, 2008). Cependant, ces résultats n'apportent pas d'informations sur l'interaction entre les neurones et les lymphocytes T CD8, et ne permettent pas d'écarter l'hypothèse d'une présentation croisée de l'Ag au niveau périphérique

J'ai donc utilisé des cultures primaires de neurones prélevés à partir de

cortex d'embryons de rats Lewis. Ces cultures neuronales, pures à plus de 85%, ont ainsi pu être infectées par le BDV, ceci n'entraînant aucune mort neuronale ou modifications de la morphologie du réseau. D'autre part, j'ai utilisé le BDV afin d'induire une neuroinflammation aiguë après inoculation intracérébrale chez le rat Lewis adulte. Après sacrifice et perfusion des animaux, les cerveaux ont été prélevés afin de purifier par tri cellulaire les LT CD8 antiviraux infiltrants.

Cela a permis d'étudier les interactions CTL/neurones ainsi que le potentiel cytolytique de LT CD8 *ex vivo* et les conséquences sur la survie neuronale.

RÉSULTATS

1. Analyse de l'interaction entre lymphocytes T CD8 et neurones

Le virus de Borna offre un modèle de choix afin d'étudier les interactions entre neurones et système immunitaire. En effet, le BDV étant un virus neurotrope, il infecte les neurones de façon persistante sans induire d'apoptose. L'infection de cultures neuronales primaires permet ainsi d'analyser la reconnaissance d'un virus par le système immunitaire dans un type cellulaire bien particulier, le neurone.

1.1. Méthodologie expérimentale

Je ne décrirai ici brièvement que la purification et culture des deux populations cellulaires d'intérêt pour mon travail, à savoir les neurones corticaux et les LT CD8 infiltrant le cerveau de rats Lewis infectés par le BDV. Le détail des matériels et méthodes nécessaires à ce travail est présenté en annexe.

1.1.1. Culture de neurones primaires et infection par le BDV

Les cultures primaires de neurones de cortex embryonnaire (E17) provenant de rat Lewis ont été mises au point au laboratoire. Brièvement, après sacrifice, les cerveaux sont prélevés et les méninges soigneusement retirées afin de prévenir l'éventuelle contamination de ces cellules. Les cortex sont disséqués puis subissent une digestion enzymatique à la papaïne. Après filtration, les neurones ainsi purifiés sont mis en culture à la densité désirée. Cette méthode permet l'obtention rapide de neurones avec un haut degré de pureté (plus de 95% de neurones). De plus, ces cultures sont très susceptibles à l'infection par les BDV puisqu'en une dizaine de jours, 100% du réseau est infecté. À ce stade, le réseau neuronal a eu un temps de maturation suffisant pour former des synapses fonctionnelles. De plus, l'infection est totalement non-cytolytique et n'engendre aucune modification majeure de la morphologie du réseau β 3-tubuline neuronal.

1.1.2. Purification des lymphocytes T CD8 infiltrant le SNC de rats infectés par le BDV

Dans le cadre de la méningo-encéphalite du rat adulte Lewis infecté par le BDV, il est possible de purifier les lymphocytes infiltrant le cerveau. Une cinétique d'infiltration des LT CD8 a été réalisée préalablement au laboratoire qui nous a permis de déterminer à 14 jours post-infection intracérébrale le pic de l'infiltration des LT CD8. Les rats sont donc sacrifiés à ce temps et perfusés afin d'éliminer les lymphocytes circulants. Les cerveaux prélevés sont ensuite digérés à la collagénase puis s'en suit une purification des populations lymphocytaires sur gradient de Percoll. Les cellules ainsi isolées sont marquées avec des anticorps spécifiques du TCR et de la chaîne β de son corécepteur CD8 afin de purifier par tri cellulaire les LT CD8. Cette méthode développée au laboratoire permet donc de purifier en quelques heures (4 heures environ), à plus de 99%, les LT CD8 infiltrant les cerveaux de rats infectés par le BDV et d'analyser leur capacité cytolytique *ex vivo* vis-à-vis de neurones cibles.

1.2. Résultats

1.2.1. Description des cultures neuronales infectées par le BDV

1.2.1.1. Analyse de la cinétique d'infection

Afin de s'assurer que la totalité des neurones en culture sont infectés, des marquages par immunofluorescence ont été réalisés systématiquement pour chaque culture. L'expression de la nucléoprotéine N du BDV a été détectée en utilisant l'anticorps polyclonal NP76, couplé à un marquage neuronal en détectant la β 3 tubuline. Ceci a permis de déterminer que 100% des neurones étaient infectés en 10 à 12 jours et qu'aucune altération visible de la morphologie neuronale n'était induite par l'infection (Figure 25).

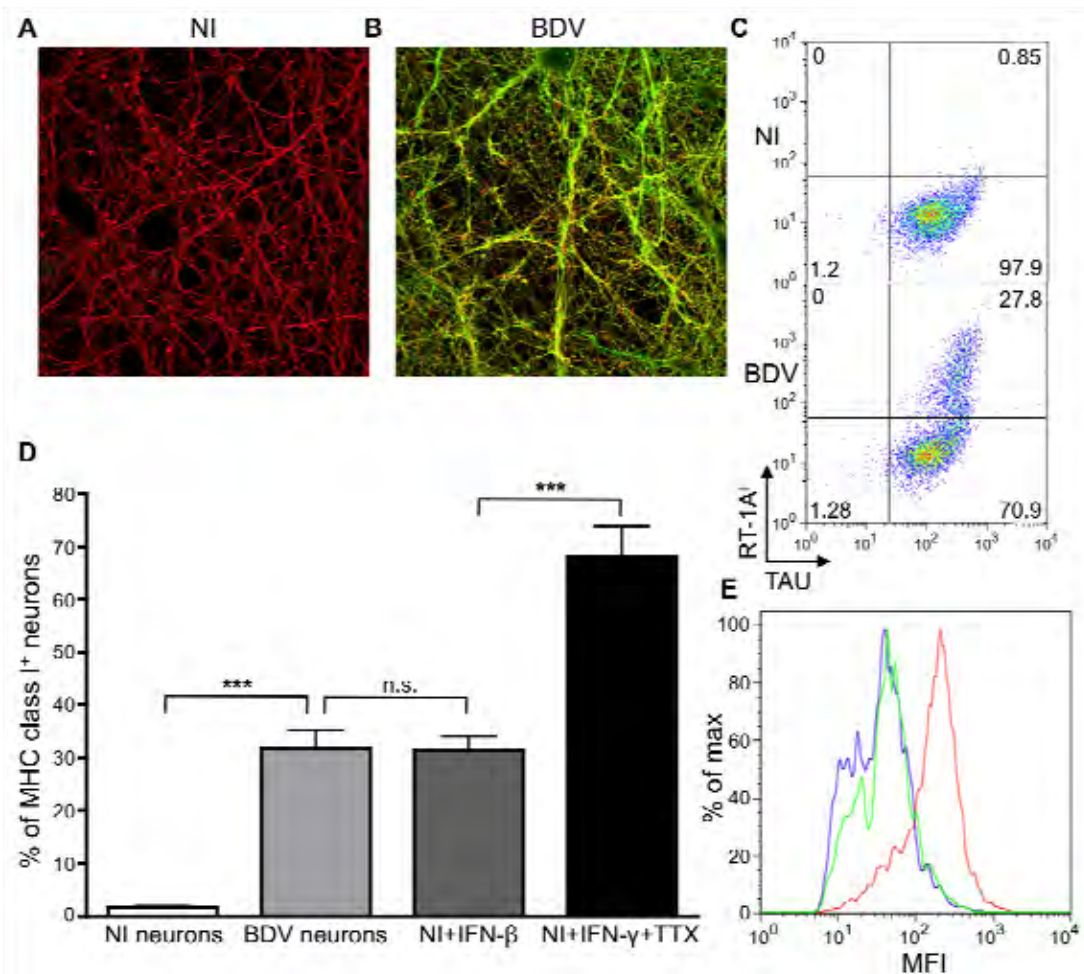


Figure 25: L'infection par le BDV induit l'expression de molécules du CMH-I par les neurones

Marquage en immunofluorescence des neurones non infectés (A) et infectés par le BDV (B) à 14 jours. La nucléoprotéine N du BDV est détectée en vert et la β 3-tubuline neuronale en rouge. (C) Dot plots représentatifs de l'expression de molécules du CMH-I (RT1a) et de la protéine neuronale TAU chez les neurones infectés (BDV) ou non (NI). (D) Les résultats quantifiés sont représentés en pourcentage de neurones (TAU⁺) CMH-I⁺. Les résultats sont exprimés comme moyenne \pm erreur type d'au moins 6 expériences indépendantes. ***, $p < 0.001$ par test de Mann-Whitney. (E) Profils d'intensité de fluorescence représentatifs de l'expression du CMH-I chez les neurones infectés par le BDV (vert), non infectés traités à l'IFN β (bleu foncé) et non infectés traités à l'IFN γ et à la TTX (rouge).

1.2.1.2. Analyse de l'expression des molécules du CMH-I par les neurones (Figure 25)

L'expression de molécules du CMH-I a été analysée à partir de marquages de neurones, après 15 jours de culture, à l'aide de l'anticorps spécifique du CMH-I de rat RT-1A¹ (clone Ox18). Les marquages ont été effectués sur des neurones infectés ou non, ainsi que sur des neurones préalablement traités à l'IFN- γ (100U/mL) et à la tétródotoxine (TTX) (1 μ M) pendant 72h, traitement connu pour induire l'expression du CMH-I à la surface des neurones (Neumann *et al.*, 1995).

En accord avec la littérature, les neurones non-infectés et non-traités n'expriment pas de CMH-I à leur surface (1% \pm 0,3%) alors que le traitement à l'IFN- γ et à la TTX induit l'expression de CMH-I par plus de 70% des neurones. De façon intéressante, l'infection par le BDV induit l'expression du CMH-I puisqu'il s'avère qu'environ 30% \pm 3,5% des neurones infectés sont CMH-I⁺. Cependant, le niveau d'expression à leur surface, c'est-à-dire la MFI (Mean Fluorescence Intensity), est plus faible que pour des neurones traités à l'IFN- γ et à la TTX. Ces données laissent envisager que les neurones pourraient être reconnus par des LT CD8.

Le mécanisme par lequel le BDV induit cette expression à la surface des neurones est inconnu à ce jour. Cependant, il est possible que le BDV provoque la production d'IFN de type I par les neurones, comme cela a déjà été démontré dans d'autres infections virales des neurones (Delhayé *et al.* 2006; Préhaud *et al.* 2005). En accord avec cette hypothèse, le traitement de neurones non-infectés par l'IFN- β pendant 72h induit l'expression de CMH-I, dans une proportion (30% \pm 3%) et à des niveaux similaires à ceux observés dans le cas de l'infection par le BDV.

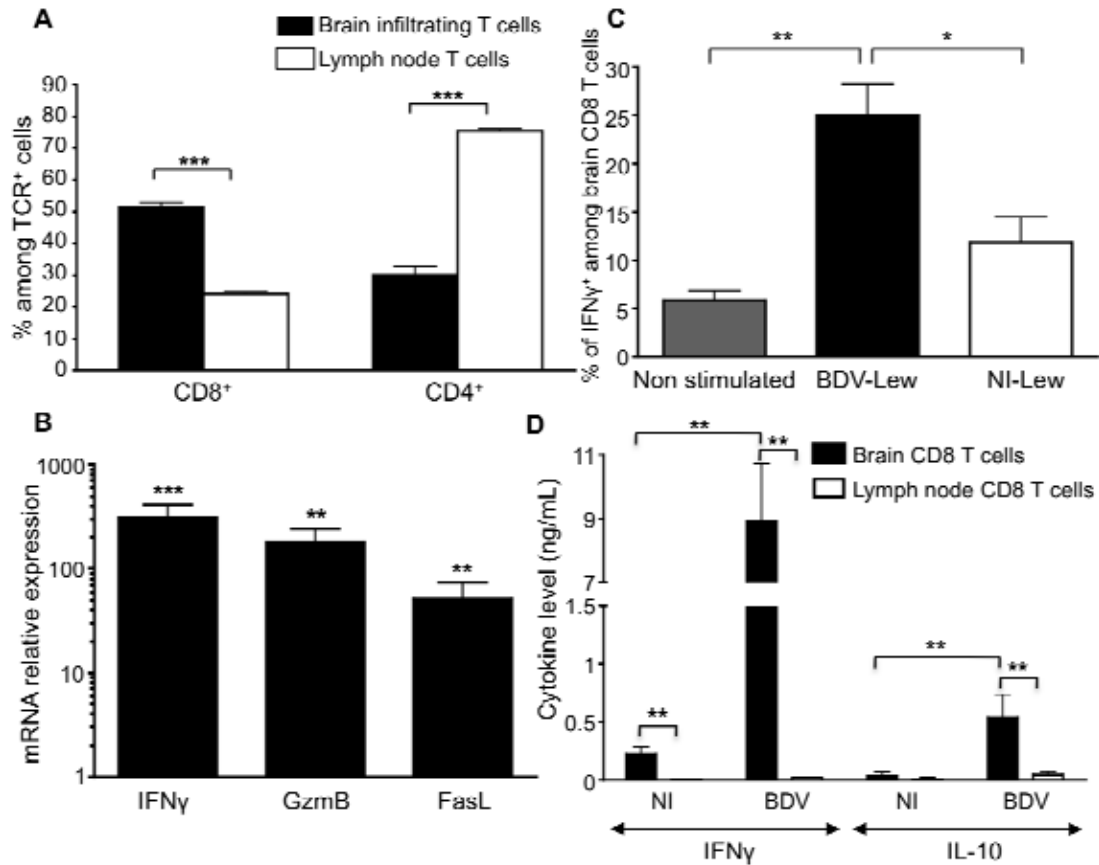


Figure 26: Caractéristiques des lymphocytes T CD8 purifiés du cerveau de rats infectés par le BDV

(A) Pourcentage de cellules CD8⁺ et CD4⁺ parmi les cellules TCR $\alpha\beta$ ⁺, purifiées de cerveau ou des organes lymphoïdes périphériques des rats infectés. (B) Expression relative d'ARNm obtenue en PCR quantitative pour l'IFN- γ , le granzyme B et FasL dans LT CD8 infiltrants (purifiés du cerveau), comparée à l'expression dans les LT CD8 périphériques et normalisée par rapport à l'actine. Les valeurs sont exprimées comme moyenne \pm erreur type d'au moins 4 expériences indépendantes. **, p<0,01; ***<0,001 par test de Mann-Whitney. (C) Pourcentage de cellules productrices d'IFN- γ parmi les LT infiltrants TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8⁺ après 48h de restimulation avec des fibroblastes infectés par le BDV (BDV APC) ou non (NI APC). Les valeurs sont exprimées comme moyenne \pm erreur type d'au moins 4 expériences indépendantes. *, p<0,05; **<0,01 par test de Mann-Withney. (D) Les cytokines des surnageants de coculture à 48h LT CD8-neurones ont été dosées au moyen de kits Luminex multiplex. Les valeurs sont exprimées comme concentration moyenne \pm erreur type d'au moins 4 expériences indépendantes. **<0,01 par testde Mann-Withney.

1.2.2. Analyse phénotypique des lymphocytes T CD8 infiltrant le cerveau de rats infectés par le BDV (Figure 26)

1.2.2.1. Description des infiltrats inflammatoires

La caractérisation phénotypique des cellules infiltrantes a été réalisée par l'analyse de marqueurs de surface en cytométrie de flux. En se basant sur une étude cinétique des cellules infiltrantes réalisée précédemment au laboratoire, à 14 jours post-infection avec la souche utilisée, la population exprimant le TCR représente environ 30 à 40% des infiltrats, le reste étant essentiellement composé de macrophages (à hauteur de 50%). Cette population de LT est composée à $51\% \pm 1,5\%$ de LT CD8 et $30\% \pm 3\%$ de LT CD4. Le rapport de LT CD8 : CD4 d'environ 2 : 1 est remarquable puisqu'en périphérie il est de 1 : 3. Cela témoigne d'un enrichissement considérable en LT CD8 dans les infiltrats inflammatoires, lors de l'infection par le BDV. De plus, la présence de LT (TCR⁺) CD8⁻ et CD4⁻ est probablement due à l'activation des LT CD8 qui peut entraîner la sous-expression du corécepteur CD8 (Robbins & McMichael, 1991). La proportion de LT CD8 est donc sans doute sous estimée dans le SNC de rats infectés.

La présence de LT CD8 à hauteur de 50% des LT infiltrants constitue un marqueur précieux d'évaluation du stade de la maladie et a été systématiquement utilisé pendant ma thèse. En effet, à des temps plus précoces ou plus tardifs de la maladie, la population de LT CD8 ne représente que 20 à 30% de la population T totale.

1.2.2.2. Analyse de l'expression d'effecteurs moléculaires cytolytiques par RT-PCR quantitative

L'expression de différentes protéines importantes dans la réponse des LT CD8 a pu être évaluée en purifiant les ARNm de ces cellules directement après le tri. Après transcription inverse afin d'obtenir de l'ADNc, l'amplification par PCR quantitative a permis de déterminer que certains effecteurs étaient nettement

surexprimés par les LT CD8 infiltrants en comparaison des LT CD8 périphériques isolés des mêmes animaux. Ainsi, les transcrits codant l'IFN- γ sont 300 ± 100 fois plus nombreux, de même 180 ± 60 fois pour le granzyme B et 50 ± 20 pour FasL. En revanche, aucune différence notable n'a été détectée pour d'autres effecteurs comme le TNF- α , l'IL-17 ou la perforine. Ces données suggèrent que les LT CD8 infiltrant le cerveau de rats infectés par le BDV ont acquis un phénotype cytotoxique.

1.2.2.3. Estimation de la proportion de lymphocytes T CD8 anti-BDV parmi les LT CD8 infiltrants

Dans des travaux précédents de mon laboratoire, il a été utilisé un pentamère de CMH-I couplé au peptide immunodominant du BDV (issu de la nucléoprotéine N) afin de déterminer la proportion de LT CD8 spécifique du BDV, ou du moins de cet épitope (Duplan *et al.*, 2007). Les résultats étaient très variables d'une expérience à l'autre, allant de 7 à 27% de LT CD8 marqués par le pentamère parmi les LT CD8 totaux. En moyenne, environ 15% des LT CD8 étaient spécifiques de l'épitope immunodominant. Nous avons tenté sans succès de réutiliser ce pentamère et nous avons décidé d'utiliser le marquage intracellulaire de l'IFN- γ après stimulation antigénique afin d'apprécier le taux de LT CD8 antiviraux.

Les LT CD8 purifiés ont été restimulés *in vitro* avec une lignée de fibroblastes de rat Lewis, infectés de façon persistante par le BDV. Après 48h de coculture, les LT CD8 ont été marqués avec des anticorps anti-CD8 β et anti-TCR $\alpha\beta$, puis perméabilisés et marqués avec un anticorps spécifique de l'IFN- γ . Le passage en cytométrie en flux a permis d'estimer que $25\% \pm 3\%$ des LT CD8 produisaient de l'IFN- γ suite à la coculture avec des fibroblastes infectés alors ce pourcentage descendait à $11\% \pm 2,5\%$ suite à la coculture avec des fibroblastes non infectés. De façon conforme avec les résultats préalablement obtenus dans le laboratoire, il semble qu'une proportion importante des LT CD8 soit spécifique du BDV, sans qu'il soit possible néanmoins d'estimer précisément ce pourcentage par cette méthode.

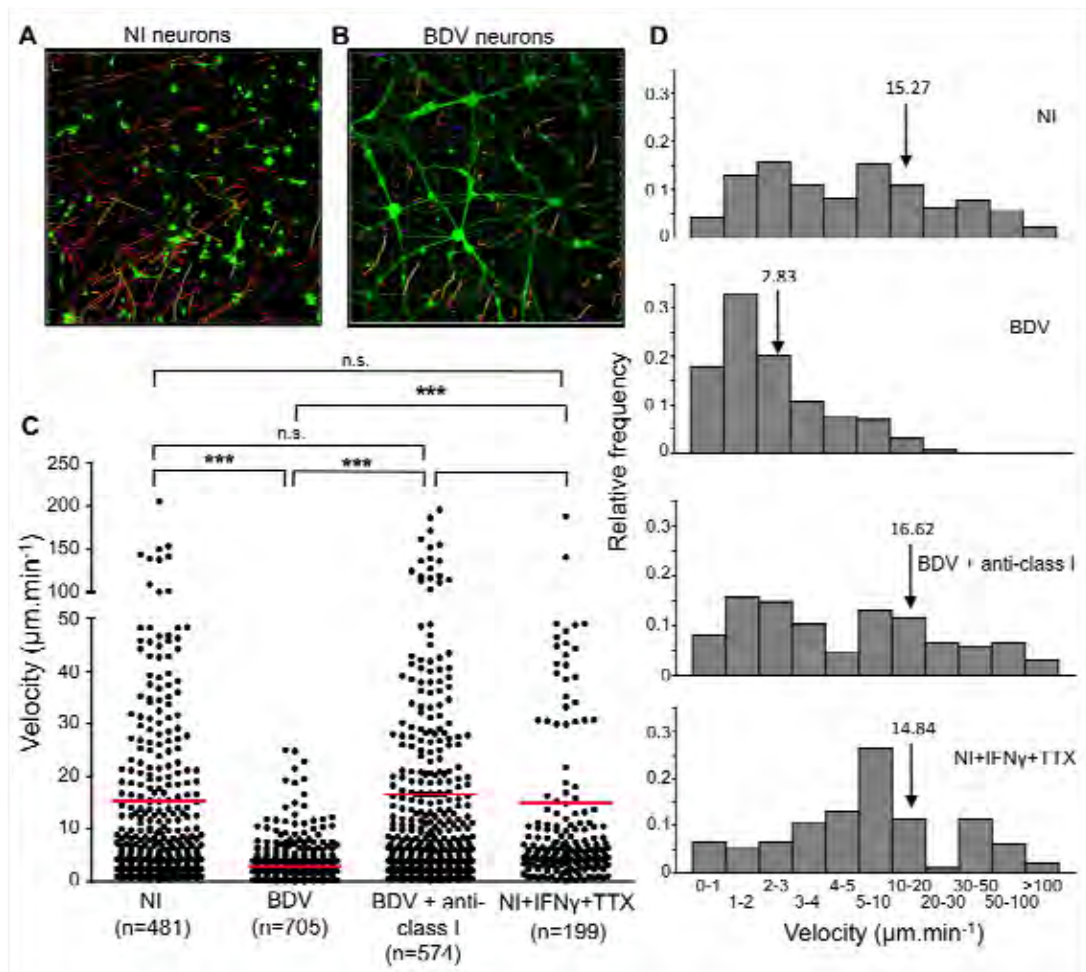


Figure 27: La mobilité des lymphocytes T CD8 infiltrants est réduite suite au contact avec des neurones de façon dépendante du CMH-I et de l'antigène.

(A) Trajets parcourus sur 30min par les LT CD8 infiltrants suite à la coculture avec des neurones infectés par le BDV ou non (B). Les LT CD8 sont visibles en rouge et les trajets parcourus sont représentés en multicolore. (C) Vitesse moyenne des LT CD8 en coculture avec des neurones. Chaque point correspond à la vitesse moyenne d'un LT CD8, les barres rouges indiquent les vitesses moyennes des populations données. La significativité statistique a été calculée au moyen d'un test de Kruskal-Wallis. ***, $p < 0.001$. (D) Fréquence relative des LT CD8 se déplaçant à diverses vitesses pour chaque condition. Les flèches indiquent la vitesse moyenne pour chaque condition.

1.2.2.4. Analyse de l'expression de cytokines après coculture avec des neurones

Après purification, les LT CD8 ont été mis en coculture pendant 48h avec des neurones primaires infectés ou non par le BDV. Les surnageants ont ensuite été récoltés et la quantité de cytokines présentes a été déterminée par Luminex. En accord avec les résultats obtenus par RT-PCR quantitative, après coculture avec des neurones infectés, les LT CD8 purifiés à partir des cerveaux produisent d'importantes quantités d'IFN- γ (9000 ± 1500 pg/mL). En revanche, la production d'IFN- γ est beaucoup plus faible (200 ± 50 pg/mL) suite à la coculture avec des neurones non infectés. De plus, les LT CD8 purifiés à partir des ganglions lymphatiques sont incapables de produire de l'IFN- γ . Ces données suggèrent donc que les LT CD8 sont capables de reconnaître des Ag viraux présentés à la surface des neurones. L'absence de production d'IFN- γ par les LT CD8 périphériques suggère également qu'aucun LT CD8 antiviral n'est présent en périphérie des animaux infectés. De plus, en accord également avec les résultats obtenus par RT-PCR quantitative, il n'a pas été possible de détecter du TNF- α et de l'IL-17.

Dans une moindre mesure, les LT CD8 infiltrants sont capables de sécréter de l'IL-10 (500 ± 200 pg/mL) suite à la coculture avec des neurones infectés. La production de cette cytokine anti-inflammatoire par les LT CD8 est peut être due à une population régulatrice qui apparaîtrait afin de résorber l'inflammation. En revanche, nous n'avons pas détecté la présence d'autres cytokines anti-inflammatoires ou de type T_H2 telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13.

1.2.3. Étude de l'interaction entre LT CD8 infiltrants et neurones

Après purification, les LT CD8 infiltrants ont pu être marqués au PKH-26 (en rouge), une sonde fluorescente s'insérant dans la membrane plasmique des cellules vivantes. Ils ont ensuite été mis en contact avec des cultures neuronales, préalablement marquées à la calcéine AM (en vert), une sonde qui devient fluorescente quand elle est métabolisée dans le cytosol de la cellule. L'interaction

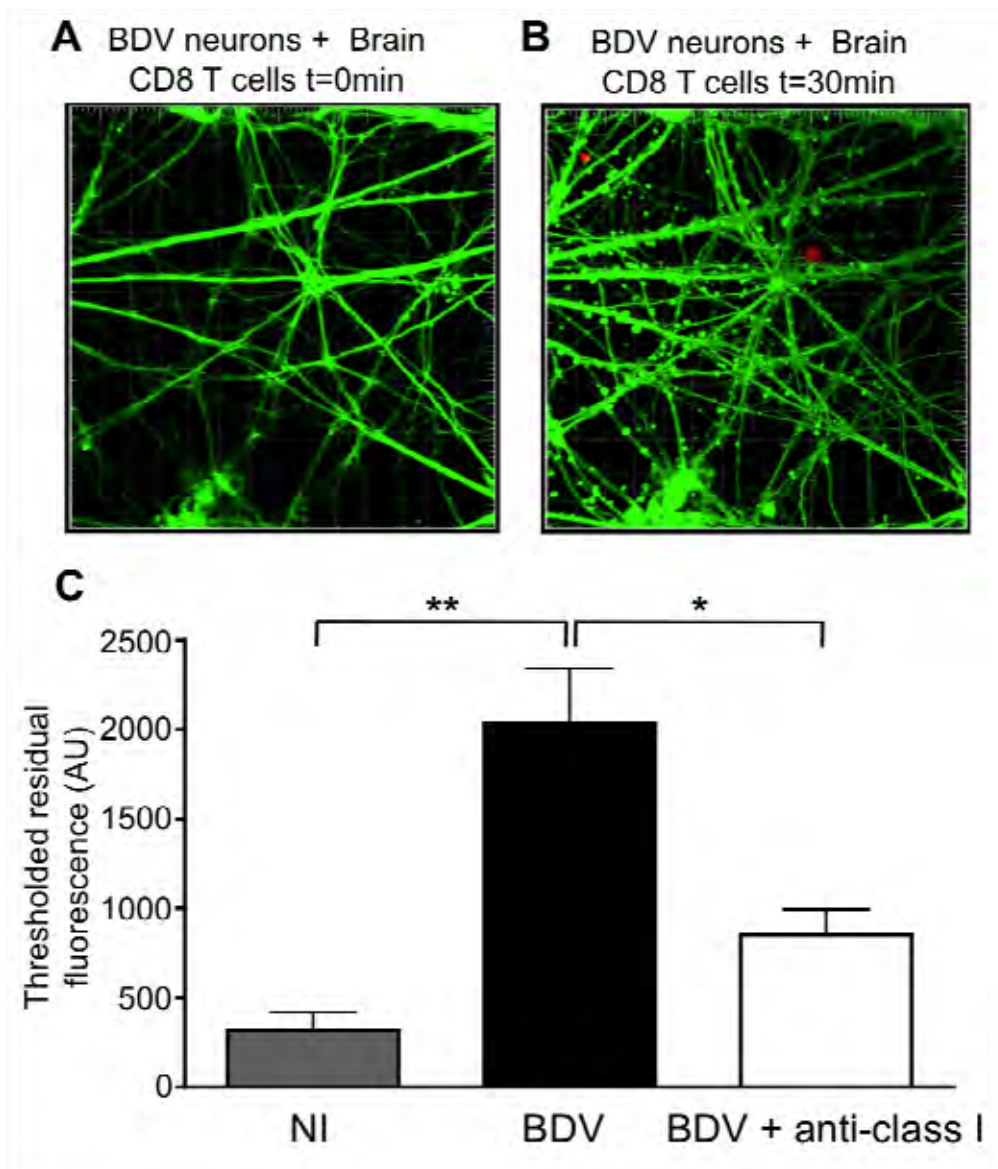


Figure 28: L'interaction avec des lymphocytes T CD8 infiltrants induit des changements morphologiques précoces des neurones infectés par le BDV

(A) Cultures neuronales infectées par le BDV chargées avec de la calcéine AM (verte) avant et 45min après (B) coculture avec des LT CD8 infiltrants marqués au PKH-26 (rouge). (C) La quantification de l'aire des protubérances a été effectuée en soustrayant dans le canal vert l'image initiale à celle à 45min. La fluorescence résiduelle ainsi obtenue, correspondant aux protubérances apparues entre les deux temps, a été quantifiée après seuillage en utilisant le logiciel Metamorph®. Les valeurs sont exprimées en fluorescence seuillée en unité arbitraire. Les valeurs sont représentées comme moyenne \pm erreur type. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ par test de Mann-Whitney.

entre les deux populations cellulaires ainsi marquées a pu être étudiée par microscopie confocale en temps réel.

1.2.3.1. Analyse de la mobilité des lymphocytes T CD8 en coculture avec des neurones (Figure 27)

Nous avons d'abord observé une différence significative de comportement des LT CD8 selon qu'ils étaient incubés avec des neurones infectés ou non. En effet, les LT CD8 présentent une mobilité élevée lorsqu'ils sont cocultivés avec des neurones non infectés. Ces LT peuvent parcourir jusqu'à plusieurs dizaines de $\mu\text{m}/\text{min}$, leur déplacement moyen étant de $15 \pm 1 \mu\text{m}/\text{min}$. En revanche, les LT CD8 incubés avec des neurones infectés présentent une réduction drastique de mobilité ($3 \pm 0,1 \mu\text{m}/\text{min}$) après seulement quelques minutes de coculture. De plus, ces interactions sont stables sur une durée de 45 à 60 minutes. De plus, le traitement préalable des neurones infectés par le BDV avec un anticorps anti-CMH-I bloquant (Ox18) restaure la mobilité des LT CD8 à un niveau tout à fait comparable à ceux en coculture avec des neurones non infectés ($16 \pm 1 \mu\text{m}/\text{min}$). Cela suggère donc que la reconnaissance du CMH-I à la surface des neurones par les LT CD8 est le phénomène responsable de cet arrêt des LT CD8. Afin de déterminer si la présence seule du CMH-I était nécessaire, la même expérience a été réalisée avec des neurones non infectés prétraités à l'IFN- γ et au TTX. Dans ce contexte, les LT CD8 conservèrent une mobilité similaire à celle observée sans le traitement anticorps anti-class I ($15 \pm 1 \mu\text{m}/\text{min}$), indiquant que c'est la reconnaissance du complexe CMH-I/peptide qui est nécessaire à l'arrêt de LT CD8.

1.2.3.2. Changement morphologique des neurones infectés induit par les lymphocytes T CD8 infiltrants (Figure 28)

Nous avons également observé que l'interaction entre LT CD8 purifiés du cerveau de rats infectés et neurones infectés entraînait des modifications de la morphologie neuronale. En effet, on observe l'apparition rapide (entre 30 à 45 minutes) de protubérances de la membrane plasmique, aussi bien au niveau

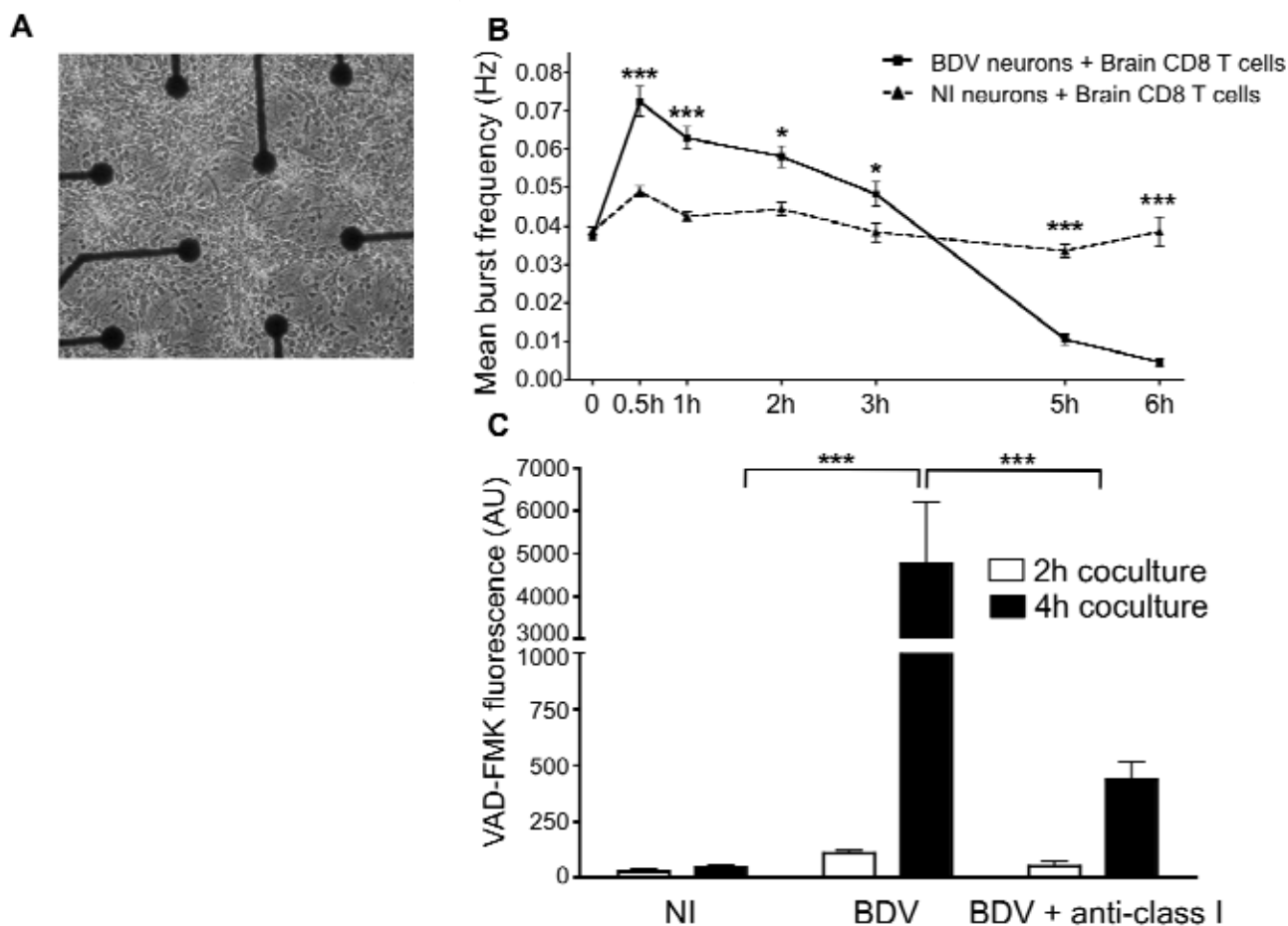


Figure 29: L'incubation avec les lymphocytes T CD8 infiltrants induit une augmentation de l'activité électrique précoce et l'apoptose neuronale

(A) Photographie de neurones corticaux cultivés sur un support MEA. Les électrodes ont un diamètre de 30 μ m et sont espacées de 200 μ m. Grossissement x50. (B) Analyse de la fréquence moyenne de "bursts" chez les neurones infectés par le BDV et non infectés, en coculture avec les LT CD8 infiltrants. Pour chaque temps d'enregistrement, les données sont acquises à partir de 102 à 462 électrodes, sur 5 expériences indépendantes. (C) Analyse de l'activation des caspases 3 et 7 dans les neurones, 2h et 4h après incubation avec les LT CD8 infiltrants. La détection des caspases activées s'est faite au moyen d'inhibiteurs fluorescents spécifiques des caspases 3 et 7. Après acquisition, la fluorescence a été quantifiée après seuillage en utilisant le logiciel Metamorph®. Les valeurs sont exprimées comme moyenne \pm erreur type. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ par test de Mann-Whitney.

somatique que sur les neurites. En revanche, l'incubation de LT CD8 infiltrants n'induit aucun changement morphologique lorsque les neurones sont non infectés. Il semble donc que les LT CD8 soient capables de reconnaître les complexes CMH-I/peptide à la surface des neurones et d'attaquer leurs neurones cibles. En effet, le traitement de neurones infectés avec l'anticorps anti-CMH-I, préalablement à l'incubation avec les LT CD8, les protège des modifications morphologiques décrites ci-dessus. Afin d'évaluer ce phénomène entre les conditions, nous avons soustrait la première image à la dernière image de chaque film (sur 45min), dans le canal vert. La fluorescence résiduelle ainsi quantifiée correspond donc aux protubérances apparues entre les deux intervalles de temps.

1.2.3.3. Changement de l'activité électrique des neurones infectés induit par les lymphocytes T CD8 infiltrants (Figure 29)

Nous nous sommes ensuite interrogés quant à l'effet de l'attaque des LT CD8 et des changements morphologiques observés sur les propriétés électrophysiologiques des neurones. Nous avons donc, en collaboration avec l'équipe du Pr. Gwendal Le Masson à Bordeaux, utilisé des chambres de culture dont le fond est constitué d'un réseau de microélectrodes, appelés MEA pour "MicroElectrode Array". Ces supports permettent ainsi d'enregistrer en temps réel l'activité électrique au voisinage de chaque électrode. Lorsqu'un neurone génère un potentiel d'action à proximité d'une électrode, celle-ci va mesurer la variation locale de courant. Un potentiel d'action apparaît donc comme un pic (ou "spike" en anglais). Ce type d'enregistrement permet d'analyser la fréquence et le moment d'apparition des pics correspondant aux potentiels d'action. Lorsque plusieurs potentiels d'action sont émis de façon rapprochée dans le temps, on parle de bouffée de potentiels d'action (ou "burst of action potential" en anglais).

En conditions basales, l'activité électrique spontanée des neurones infectés ou non est équivalente ($0,037 \pm 0,0008$ Hz vs $0,038 \pm 0,0011$ Hz, respectivement). Suite à l'incubation avec les LT CD8 infiltrants, on observe une augmentation rapide de la fréquence des "bursts" des neurones infectés ($0,074 \pm 0,0038$ Hz), qui reste

maintenue pendant au moins 3h ($0,048 \pm 0,0031$ Hz) avant de chuter brutalement pour être quasiment nulle ($0,005 \pm 0,0009$ Hz) 6h après le début de la coculture, suggérant la mort des neurones. En revanche, l'activité électrique des neurones non infectés ne semble pas être affectée par la coculture avec les LT CD8 infiltrants, puisque 6h après le début de l'incubation, la fréquence des "bursts" est équivalente à la fréquence spontanée ($0,038 \pm 0,0038$ Hz vs $0,038 \pm 0,0011$ Hz, respectivement).

1.2.3.4. Induction de l'apoptose neuronale par les lymphocytes T CD8 infiltrants (Figure 29)

Nous avons ensuite analysé l'induction de l'apoptose dans des neurones infectés suite à l'incubation avec des LT CD8 infiltrants. Pour cela, nous avons détecté l'activation des caspases 3 et 7 au moyen d'un kit (Image-iT™ LIVE Green Caspase-3 and -7 Detection Kit de Molecular Probes) basé sur des inhibiteurs fluorescents spécifiques des caspases (FLICA™). La fluorescence est donc une mesure directe de la quantité de caspases activées au moment du marquage. La quantification de la fluorescence obtenue nous a permis donc d'évaluer l'induction de l'apoptose dans les neurones. Après 2h de coincubation LT CD8 infiltrants/neurones infectés, nous n'avons pu détecter aucune fluorescence spécifique des neurones (100 ± 10 AU). En revanche, après 4h de coincubation, nous avons pu observer l'activation des caspases 3 et 7 dans les neurones infectés (5000 ± 1500 AU), alors que cela n'est pas le cas dans les neurones non infectés (45 ± 10 AU). De plus, le traitement préalable des neurones infectés avec l'anticorps bloquant anti-CMH-I (Ox18) protège les neurones de l'apoptose (400 ± 75 AU), confirmant que l'attaque des neurones par les LT CD8 est un processus dépendant de la reconnaissance du complexe CMH-I/Ag viral par les LT CD8.

En utilisant le modèle du virus de Borna, nous avons pu montrer que la réponse immunopathologique due à l'infection était liée à la reconnaissance spécifique du virus par les LT CD8. En effet, des neurones primaires infectés *in vitro* expriment des molécules du CMH-I à leur surface, sans traitement particulier nécessaire. D'autre part, les LT CD8 purifiés de cerveaux de rats infectés par le BDV

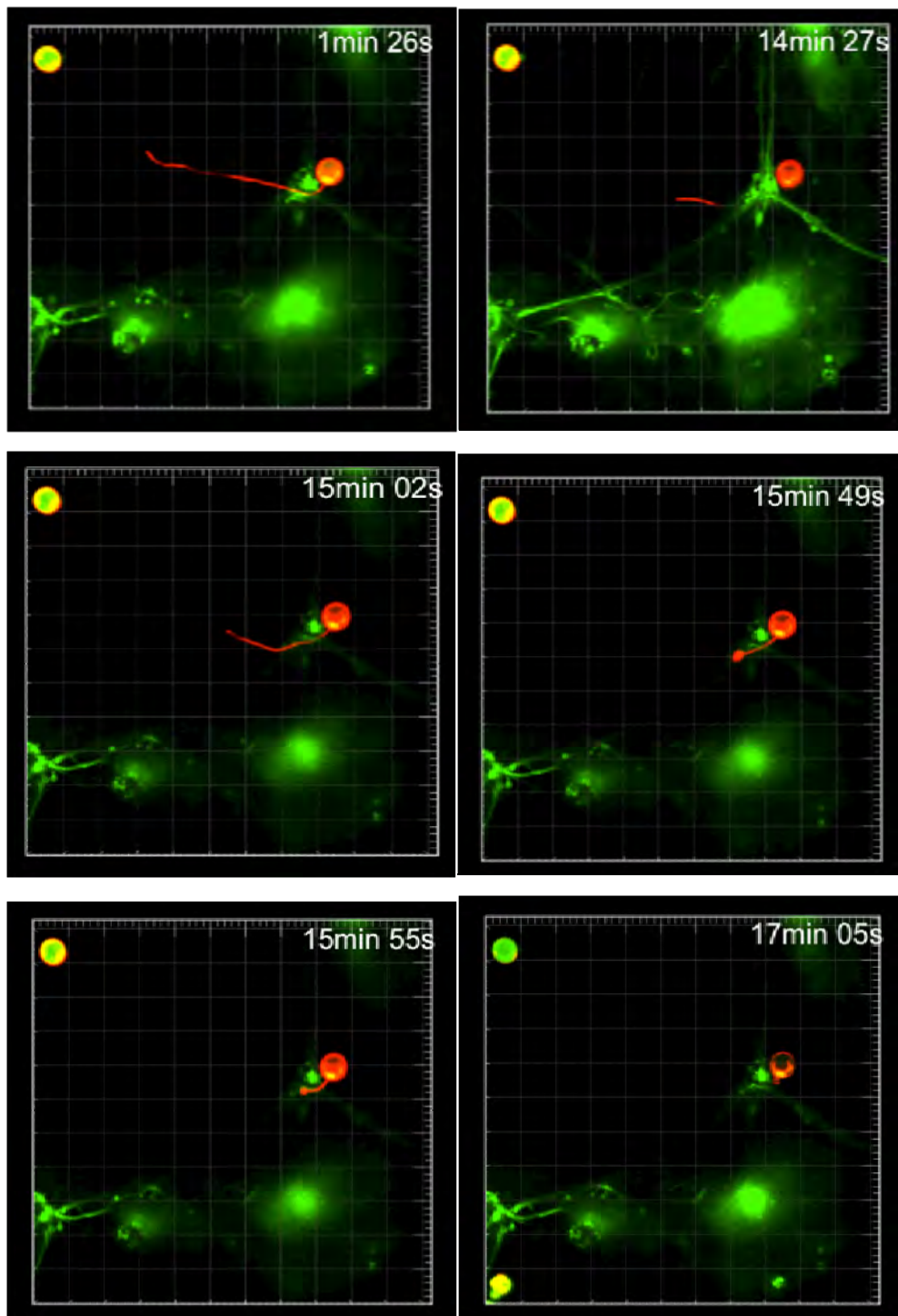


Figure 30: Rétraction d'un prolongement membranaire de LT CD8 infiltrant

Ces différentes images montrent un LT CD8 infiltrant marqué au PKH-26 (rouge) en contact avec un corps neuronal marqué à la calcéine AM (vert). Le lymphocyte émet un prolongement d'une longueur de 50 μ m, mobile et d'une taille stable pendant 15min. Le prolongement se rétracte alors rapidement (moins d'une minute).

ont acquis un phénotype cytotoxique comme l'expression d'ARNm d'effecteurs cytolytiques le démontre. De plus, une proportion importante semble être spécifique du virus, bien que cela soit difficile à déterminer avec précision. Enfin, l'incubation de ces CTL infiltrants avec des neurones infectés induit leur apoptose, dépendante de la reconnaissance de complexes CMH-I/Ag viral à la surface des neurones cibles. Ce phénomène est relativement tardif et est précédé de changements morphologiques particuliers et d'une hyperactivité électrique.

Toutes ces données prises dans leur ensemble sont la première démonstration formelle que des neurones peuvent naturellement exprimer des complexes CMH-I/Ag viral (sans qu'il y ait nécessité d'un milieu inflammatoire particulier), les rendant susceptibles à l'attaque par des LT CD8 générés au cours d'une pathologie du CNS.

2. Observation d'un comportement membranaire particulier des lymphocytes T CD8 infiltrants

A la suite des expériences décrites ci-dessus, nous avons fait l'observation de LT CD8 munis d'extensions membranaires importantes. Nous avons fréquemment observé ces prolongements d'une longueur moyenne de 50 μm et d'un diamètre d'environ 0,5 μm . Toutefois, certains peuvent avoir une longueur beaucoup plus longue, allant jusqu'à 270 μm pour le cas le plus extrême rencontré (Figure 31). Plusieurs prolongements peuvent être observés partant du même lymphocyte, ceux-ci étant alors d'une longueur bien moindre mais néanmoins supérieure à celle d'un filopode. De façon intéressante, ces prolongements sont caractérisés par une très grande mobilité les rendant difficilement enregistrables en microscopie confocale, compte tenu de la tridimensionnalité des mouvements et du temps nécessaire à l'enregistrement de chaque image. De plus, ce phénomène très dynamique semble être contrôlé puisque l'observation a été faite de certains prolongements se rétractant spontanément et très rapidement. Ainsi, il suffit de deux minutes à un prolongement de 100 μm pour se "résorber" (Figure 30). De façon similaire aux nanotubes, ces prolongements sont capables de connecter entre eux deux LT CD8 à

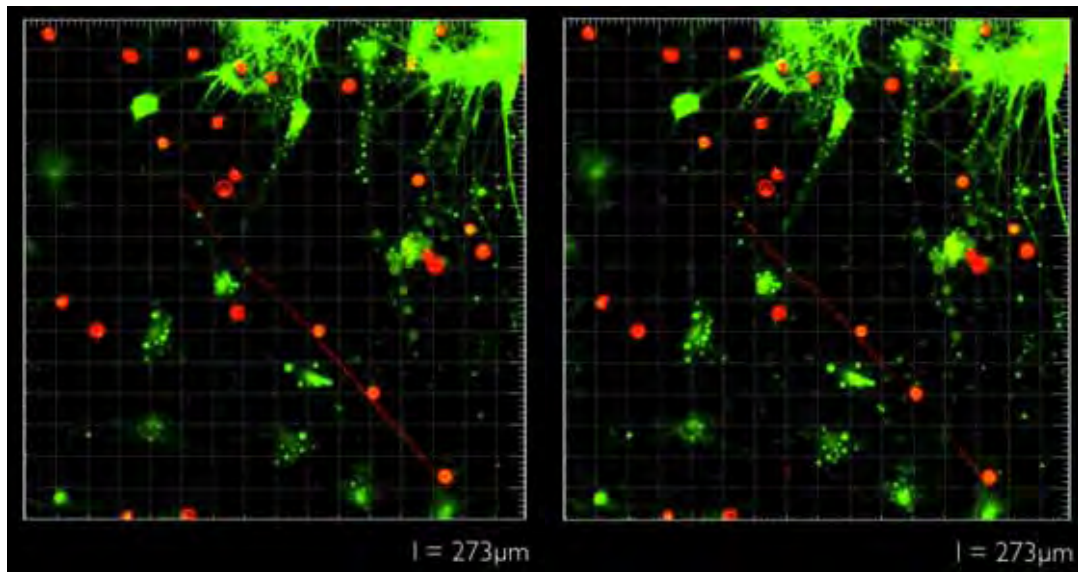


Figure 31 : Prolongement membranaire de 270 μ m d'un LT CD8 infiltrant
A noter qu'ici encore, le LT CD8 est en contact avec le soma d'un neurone.

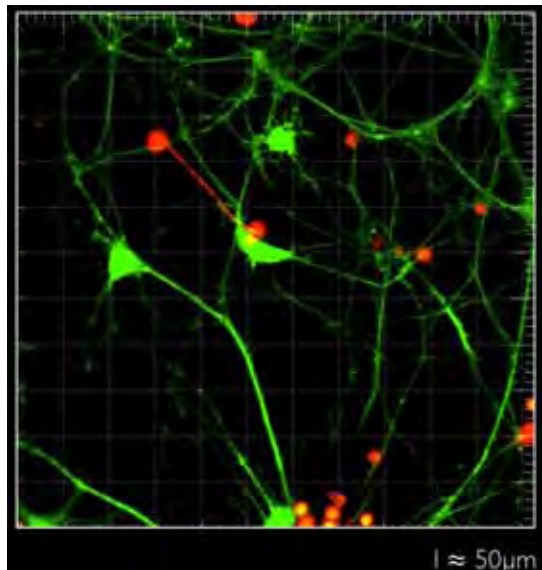


Figure 32 : Connection membranaire entre deux LT CD8 infiltrants

distance, bien que cette observation ne fut que peu de fois confirmée (Figure 32). Il a également été observé que les LT CD8 qui émettaient des prolongements étaient souvent en contact du corps cellulaire d'un neurone.

La réalité de ce phénomène et son importance dans la reconnaissance des cellules cibles restent à déterminer et seront discutés dans la partie suivante.

DISCUSSION

1. Le BDV, un outil pour une meilleure compréhension des mécanismes immunopathologiques dans le SNC ?

1.1. Les lymphocytes T CD8 sont-ils les effecteurs majeurs d'une réponse immune délétère pour le SNC ?

Dans notre étude, nous avons montré que les neurones sont capables d'exprimer les molécules de CMH-I après infection par le BDV, et sont reconnus *in vitro* par les CTL générés au cours de l'infection naturelle et n'ayant subi aucune manipulation supplémentaire.

1.1.1. Dissection des mécanismes moléculaires de neurotoxicité

Une des premières perspectives de ce travail consiste en l'analyse des mécanismes de lyse médiée par les CTL. En effet, nous avons montré que la lyse des neurones infectés par les LT CD8 purifiés du cerveau dépend de la reconnaissance du complexe CMH-I/Ag viral présenté par les neurones. En revanche, nous ne sommes pas en mesure de préciser si la cytotoxicité est médiée par la voie Fas ou par les mécanismes de sécrétion de perforine/granzyme. La cytotoxicité induite par Fas (Medana *et al.*, 2000) comme celle induite par les système perforine/granzyme (Rensing-Ehl *et al.*, 1996) ont été décrits comme étant effective vis-à-vis des neurones. La mort relativement lente (4 à 6h) des neurones est plutôt en accord avec une apoptose induite par Fas plutôt que par le système granzyme/perforine (Kägi *et al.*, 1996; Chávez-Galán *et al.*, 2009). Toutefois, les LT CD8 antiviraux infiltrants mis en contact avec des cibles plus conventionnelles comme des fibroblastes infectés marqués à la calcéïne sont capables d'induire la perte de cette sonde du cytoplasme en 30 à 45 minutes, suggérant un mécanisme rapide de destruction de l'intégrité membranaire de la cellule cible par la perforine.

L'expression d'ARNm est augmentée en ce qui concerne le granzyme B et

FasL. L'absence de surexpression de l'ARNm de la perforine n'est pas nécessairement synonyme d'absence de cette protéine, qui pourrait être exprimée constitutivement et donc permettre de délivrer le granzyme dans la cellule cible. Cela ne permet donc pas de discriminer entre les 2 voies de cytolyse. Il n'existe malheureusement pas encore de lignées de rats déficients pour l'un ou l'autre de ces effecteurs, comme c'est le cas chez la souris. Nous avons donc tenté de bloquer l'une et l'autre des deux voies au moyen d'inhibiteurs spécifiques. En effet, la wortmannine, qui inhibe la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), prévient l'expression de FasL induite par le TCR sans affecter la cytotoxicité dépendante de la perforine. A l'inverse, l'inhibiteur de la protéine kinase C (PKC) Gö6976 prévient complètement la cytotoxicité dépendante de la perforine en n'affectant que modérément l'expression de FasL induite par le TCR (Pardo *et al.*, 2003). Toutefois, l'utilisation de ces inhibiteurs spécifiques ne nous a pas permis d'obtenir de résultats convaincants. D'autre part, le développement récent d'anticorps spécifiques de CD107a (ou LAMP-1 pour Lysosomal Associated Membrane Protein-1) réagissant chez le rat permettrait de visualiser la dégranulation des LT CD8.

1.1.2. Le BDV protège-t-il de l'apoptose ?

La résistance relative des neurones infectés à la mort induite par les CTL pourrait être liée au virus lui-même plutôt qu'au type cellulaire concerné. En effet, des travaux récents montrent que la protéine X du BDV s'accumule au niveau mitochondrial dans la cellule infectée et inhibe l'apoptose induite par Fas dans les cellules d'astrocytome de rat C6 (Poenisch *et al.*, 2009). Un virus recombinant possédant une protéine X mutée ayant perdu sa localisation mitochondriale est incapable de protéger de l'apoptose. Afin de tester si la protéine X était également impliquée dans la résistance à l'apoptose induite par les CTL, nous avons obtenu ce virus recombinant (U.Schneider, Freiburg) et nous avons infecté des neurones primaires. À la suite de l'incubation avec des LT CD8 infiltrants, aucune différence n'a été observée quant à l'induction de l'apoptose entre neurones infectés par le virus sauvage et le virus recombinant. Il est cependant possible que la voie moléculaire d'induction de l'apoptose soit différente dans notre système. En effet, dans les

travaux précédemment cités, l'apoptose avait été induite par un anticorps agoniste anti-Fas DX2. Si la protéine X peut effectivement protéger de l'apoptose induite par Fas dans ce système, il est cependant envisageable que les niveaux d'expression de FasL à la surface des lymphocytes ou de Fas à la surface des neurones ne soient pas comparables et que la protéine X ne puisse pas protéger d'un signal de mort plus puissant, comme celui délivré par les CTL.

1.1.3. Rôle de l'immunité innée neuronale dans l'expression du CMH-I

Nous avons fait l'observation originale dans notre système de l'expression de molécules du CMH-I à la surface de neurones cultivés *in vitro* et infectés par le BDV. Les mécanismes moléculaires par lesquels cette expression a lieu sont inconnus à ce jour. Il a été montré que l'infection de neurones par le BDV bloque la potentialisation à long terme, un phénomène électrophysiologique particulier du réseau neuronal (Volmer *et al.*, 2007; Prat *et al.*, 2009). Il est donc possible que le virus interférant avec l'activité électrique des neurones induise ainsi l'expression du CMH-I, de façon similaire à l'action de la TTX.

D'autre part, l'expression de molécules du CMH-I par les neurones pourrait être liée à la réponse immunitaire innée des cellules infectées. En effet, les neurones peuvent produire de l'IFN- β en réponse à une infection virale (Delhaye *et al.*, 2006; Préhaud *et al.*, 2005) et on ne peut écarter la possibilité que ce soit également le cas suite à l'infection par le BDV. Des données obtenues par microarray au sein du laboratoire ont montré l'expression dans des neurones infectés de gènes de réponses à l'IFN, tels que Mx et la vipérine. De plus, le traitement de neurones non infectés à l'IFN- β pendant 72h induit l'expression du CMH-I dans une proportion et à des niveaux similaires à ceux observés dans le cas de l'infection par le BDV. Ce résultat renforce l'hypothèse d'une induction du CMH-I dépendante de l'IFN- β suite à l'infection par le BDV. Pour la confirmer, nous pourrions bloquer l'IFN- β extracellulaire par l'ajout d'un anticorps anti-IFN- α/β dans le milieu de culture des neurones infectés. Il est également important de noter que les cultures neuronales étudiées ne sont pas pures à 100% et les cellules gliales contaminantes pourraient être les productrices d'IFN de type 1.

1.1.4. Développement d'approches *in vivo*

Nous devrions également étayer nos résultats par des observations *in vivo* de l'interaction physique entre une cellule effectrice et un neurone infecté en utilisant des approches technologiques plus performantes, comme l'imagerie par microscope biphoton ou multiphoton sur des coupes de cerveaux ou chez l'animal vivant. Cela a déjà été développé notamment dans des modèles de pathologies du SNC traumatiques comme l'axotomie et les lésions de la moelle épinière, dégénératives dans des modèles de la maladie d'Alzheimer ou de SLA, d'origine autoimmune comme le modèle EAE, des encéphalites infectieuses, l'ischémie cérébrale et l'épilepsie (Misgeld & Kerschensteiner, 2006). Il s'avère que la conformation tridimensionnelle du tissu induit des comportements migratoires particuliers des lymphocytes et les résultats que nous avons pu obtenir *ex vivo* pourraient être sensiblement différent *in situ*.

1.2. Le caractère résolutif de la maladie de Borna: nouvelles voies d'investigation de la réponse immune régulatrice dans le SNC ?

Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur la phase effectrice de la maladie. Or, dans le modèle d'infection du rat Lewis adulte par le BDV, l'encéphalite médiée par la réponse immune a un caractère résolutif notable. Nous avons ainsi constaté qu'en gardant les animaux au delà d'une trentaine de jours, la mortalité concernait finalement 50 à 70% des individus. Cette phase chronique correspond à une disparition des infiltrats du SNC alors même que le virus persiste et continue à se propager dans le SNC. Il s'agit alors d'identifier quels phénomènes sont responsables de la régulation de la réponse immunitaire antivirale dans le SNC.

1.2.1. Épuisement des CTL

Il a été envisagé, par analogie avec d'autres systèmes, que cette phase de la maladie serait liée à un épuisement de la réponse des lymphocytes T à haute affinité

pour le virus. En effet, les infections chroniques sont souvent caractérisées par un dysfonctionnement des lymphocytes T spécifiques du virus (Zinkernagel *et al.*, 1999). Cet épuisement des CTL serait la raison principalement évoquée pour expliquer l'incapacité de l'organisme à se débarrasser des virus persistants comme HIV, HCV, HBV ou encore le LCMV. Dans le cas d'infections chroniques avec certaines souches de LCMV, les LT CD8 sont présents dans les tissus infectés sous une forme anergique (Binder *et al.*, 1998). Cet état d'épuisement est caractérisé par l'absence de prolifération de ces cellules ou de production d'IFN- γ . L'épuisement de la réponse immune a été défini à cette occasion sans identification de mécanismes précis. Récemment, il a été démontré que ce phénomène pourrait être lié à l'augmentation de l'expression du facteur PD-1, un récepteur inhibiteur de la famille CD28, qui intervient au niveau du TCR des LT (Barber *et al.*, 2006). Il serait donc intéressant d'étudier l'expression du récepteur PD-1 dans le cas de l'infection chronique par le BDV pour tester cette hypothèse.

1.2.2. Délocalisation du corécepteur CD8 du complexe TCR

De plus, ce défaut fonctionnel pourrait être transitoire et lié à la perte d'avidité du complexe TCR pour l'antigène du fait de la dissociation du corécepteur CD8 (Demotte *et al.*, 2002). Cette hypothèse est en bonne corrélation avec certaines observations réalisées dans les systèmes d'immunopathologie provoquée par le BDV. En effet, dans le modèle murin, il a été montré que des clones spécifiques du BDV perdaient leur fonction effectrice de manière dépendante de leur incubation in vitro en présence de quantités importantes de peptide N. La fonction effectrice était restaurée en incubant les LT en l'absence d'antigène (Engelhardt *et al.*, 2005). Des résultats précédemment obtenus au sein du laboratoire ont montré que le pourcentage de LT CD8 infiltrants reconnus par le pentamère spécifique du BDV augmentait après une phase de "repos", sans stimulation antigénique (Duplan *et al.*, 2007). Le cerveau des rats infectés représente en effet un milieu extrêmement riche en Ag du virus. La galectine 3 a été impliquée dans la perte d'avidité des CTL pour leur cible, par sa promotion de la dissociation du TCR et de la molécule CD8 (Demotte *et al.*, 2008). Nous avons voulu tester cette hypothèse en utilisant la N-

acetyllactosamine (LacNAc), un ligand compétitif de la galectine qui prévient la dissociation CD8/TCR. Malheureusement, nous avons été confrontés à une perte d'activité du pentamère utilisé dans nos travaux précédents, qui ne marquait plus efficacement les LT CD8 anti-BDV. Il n'a pas été possible d'obtenir une nouvelle synthèse de ce réactif et il m'a donc été impossible de tester cette hypothèse dans notre modèle.

1.2.3. Induction de lymphocytes T CD8 régulateurs

Une autre hypothèse, non mutuellement exclusive avec les précédentes, serait la contribution de cellules T possédant un potentiel régulateur. Celles-ci pourraient être du type classique CD4⁺ Foxp3⁺, ou bien appartenir à la population régulatrice T CD8 définie dans notre équipe par le niveau d'expression de la molécule CD45RC (CD45RC^{low}) (Xystrakis *et al.*, 2004). En effet, des résultats obtenus au sein du laboratoire ont montré que des cellules de phénotype Foxp3⁺ ou CD45RC^{low} étaient peu nombreuses au cours de la phase effectrice, mais que la proportion des cellules Foxp3⁺ ou CD45RC^{low} augmentait au cours du temps puis régressait avec la disparition des infiltrats. D'autre part, nous avons observé que les LT CD8 infiltrants cultivés avec des neurones infectés produisaient de l'IL-10, suggérant l'apparition d'une population régulatrice.

L'importance des LT CD8 régulateurs a été mise en évidence dans la SEP (Correale & Villa, 2008; Tennakoon *et al.*, 2006) et dans l'EAE (Lee *et al.*, 2008). Les LT CD8 régulateurs jouent un rôle clé dans l'homéostasie immunitaire. Ils exercent leur activité suppressive au moyen de différents mécanismes, incluant la sécrétion de cytokines (IL-10, TGF-β), l'induction de l'anergie des CPA ou la cytotoxicité directe (Nieder Korn, 2008; Dinesh *et al.*, 2010). De plus, l'IFN-γ joue un rôle crucial dans l'induction et l'expression de l'activité des LT CD8 régulateurs.

Il s'agit maintenant de mieux caractériser cette population et d'étudier si elle peut avoir un rôle régulateur de la réponse immune spécifique du virus au sein du SNC. Notre système *ex vivo* pourrait permettre de tester le potentiel régulateur de ces cellules et leur capacité à limiter une attaque neuronale. Nous aurions besoin dans ce cas de pouvoir détecter des populations régulatrices grâce à un marqueur de

surface, car Foxp3 est à localisation nucléaire et ne peut être utilisé pour marquer des cellules vivantes. Les marqueurs de surface des LT CD8 régulateurs les plus communément décrits sont CD25 et l'absence de CD28 ; d'autres ont également été rapportés tels que CD103, CD122, CTLA-4 et GITR. Le taux d'expression de la molécule CD45RC pourrait également correspondre au marqueur recherché. En effet, elle est exprimée à la surface des LT du rat et son niveau d'expression est déterminant dans la différenciation des LT CD8.

2. Le “bubbling” neuronal, signe précoce de souffrance neuronale liée à l’attaque par les CTL ?

Suite à l'interaction avec des CTL infiltrants, les neurones infectés marqués à la calcéine développent des renflements de leur membrane, que ce soit au niveau des neurites ou du soma. Il y a deux explications possibles à cette observation : il pourrait s'agir d'une fuite de la calcéine du cytoplasme neuronal, auquel cas il semblerait que l'intégrité membranaire du neurone soit perdue ce qui impliquerait plutôt la voie d'apoptose induite par la perforine. Néanmoins, il est envisageable que les multiples canaux transmembranaires situés dans la membrane plasmique des neurones puissent s'ouvrir suite à un signal endogène de la cellule en souffrance. D'autre part, il est possible que le neurone conserve son intégrité membranaire mais que la forme de la cellule soit altérée par des renflements membranaires, à la manière des cellules tumorales attaquées par des CTL qui forment des renflements de leur membrane (appelés “blebs” en anglais) (Caramalho *et al.*, 2008). Afin de discriminer entre ces deux possibilités, le marquage préalable des neurones au PKH-26 qui s'insère dans les membranes puis à la calcéine pourrait permettre de déterminer si ces renflements membranaires conservent une membrane plasmique. Une telle expérience a été réalisée et, bien que le marquage au PKH-26 ne soit pas très efficace sur les réseaux neuronaux, il semble que la membrane plasmique soit toujours présente. Néanmoins, afin de confirmer cette observation, l'usage de la microscopie électronique permettrait de déterminer la présence d'une membrane plasmique au niveau de ces renflements.

Il a été décrit un phénomène similaire dans la dégénérescence Wallérienne induite par axotomie dans des cultures de neurones de ganglion spinal *in vitro* (Sievers *et al.*, 2003). Dans cette étude, le premier signe de dégénérescence est l'aspect moniliforme que prennent les neurites 1h après l'induction de la lésion, suivi par le bourgeonnement de leur membrane et leur fragmentation. Si les premiers signes sont à proximité immédiate du site lésionnel, ils se propagent le long des neurites lésés et leur désintégration complète à distance du site initial est observée 12 à 24h après l'axotomie. De plus, des observations très récentes ont permis d'identifier un phénomène très similaire, que ce soit chez la souris *in vivo* suite à l'induction de l'EAE ou dans les lésions de patientes souffrant de la SEP (Nikić *et al.*, 2011). Celui-ci dénommé "dégénérescence focale axonale" est caractérisé par différentes étapes, en commençant par des renflements localisés jusqu'à la fragmentation de l'axone. De façon intéressante, il apparaît que les axones à l'aspect moniliforme peuvent rester en l'état plusieurs jours et retourner spontanément à l'état normal. Cet état transitoire et réversible de l'axone est le premier signe de lésion axonale. En réalité, il s'accompagne d'altérations du réseau mitochondrial dues aux espèces réactives de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species) et de l'azote (RNS, Reactive Nitrogen Species) et la neutralisation de ces espèces chimiques permet de restaurer les axones qui sont déjà rentrés dans le processus dégénératif. La possibilité de "sauver" les axones déjà lésés ou souffrant lors d'une neuroinflammation ouvre la porte à de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de limiter les dommages neuronaux en conditions neuroinflammatoires. L'utilisation d'un modèle *in vitro* comme celui du BDV pourrait permettre de mieux disséquer les voies moléculaires mises en jeu dans ce phénomène réversible et de tester les candidats potentiels.

3. Les extensions membranaires des lymphocytes T CD8 purifiés de cerveaux de rats infectés par le BDV: un phénomène spécifique aux lymphocytes infiltrant le SNC ?

Comme décrit précédemment, certains LT CD8 observés *ex vivo* présentaient des prolongements de leur membrane extraordinairement longs et mobiles. Les seules observations apparentées sont celles des nanotubes.

Les nanotubes sont distincts des autres extensions membranaires, comme les filopodes et les ponts cellulaires issus de la mitose, puisqu'ils se forment lorsque des cellules entrent en contact et s'éloignent, restant ainsi connectées (Sowinski *et al.*, 2008). Ils ne sont pas attachés au substrat de culture, ce qui les différencie également des filopodes (Faix & Rottner, 2006). Les cellules sont généralement connectées entre elles par un seul nanotube bien que plusieurs nanotubes puissent connecter plusieurs LT entre eux. Les nanotubes des LT contiennent de l'actine F mais pas de microtubules, contrairement à ceux décrits chez les macrophages (Onfelt *et al.*, 2006). En revanche, les microtubules sont présents au niveau des jonctions membranaires entre cellules filles issues d'une division, démontrant clairement qu'il s'agit d'une connexion cellulaire distincte.

Il a été décrit que les LT Jurkat forment des nanotubes qui ont une longueur moyenne de $22 \pm 3 \mu\text{m}$, c'est-à-dire 5 à 10 fois plus longs que les ponts formés par les filopodes (Sherer *et al.*, 2007). Certains ont été décrits comme pouvant atteindre $100 \mu\text{m}$. En revanche, les nanotubes qui se forment entre cellules cultivées sur un support tridimensionnel, plus proche des conditions de migration cellulaire *in vivo*, ont une longueur moyenne de $40 \pm 7 \mu\text{m}$ et peuvent atteindre $200 \mu\text{m}$. Contrairement au support bidimensionnel classique, la matrice tridimensionnelle aide les nanotubes à adopter une morphologie courbée, ce qui permet une connexion plus grande entre cellules. L'activation de LFA-1 pourrait aider à la formation de nanotubes entre LT (Obermajer *et al.*, 2009), bien que les mécanismes moléculaires régissant ce phénomène sont encore inconnus à ce jour.

La communication intercellulaire par le biais de connexions directes à longue distance permet une plus grande spécificité qu'avec des médiateurs solubles (Davis, 2009; Onfelt *et al.*, 2005) et il existe des arguments en faveur d'une transmission de signaux calciques entre cellules myéloïdes (Watkins & Salter, 2005). De plus, il a été démontré que les cellules NK pouvaient interagir avec leurs cellules cibles par des nanotubes, la suppression de ces derniers à l'aide d'un microscalpel réduisant la lyse des cellules cibles (Chauveau *et al.*, 2010). Les nanotubes pourraient donc permettre de tuer à distance et la migration polarisée de la cellule cible au NK.

Les pathogènes semblent capables d'utiliser ces connexions pour se disséminer efficacement de cellule à cellule, comme démontré pour le HIV et les prions (Sowinski *et al.*, 2008; Gousset *et al.*, 2009). Les nanotubes peuvent même être une voie de dissémination virale essentielle puisque le transfert du HIV de cellules infectées à des cellules non infectées est presque totalement abrogé lorsque les cellules sont cultivées sous agitation ou séparées par un "transwell", empêchant toutes connexions intercellulaires. *In vivo*, les nanotubes ont été décrits comme connectant des cellules myéloïdes dans la cornée de souris et leur fréquence augmente à la suite d'un traitement par le LPS (Chinnery *et al.*, 2008). Les nanotubes pourraient donc permettre d'augmenter la durée des contacts intercellulaires et de connecter les cellules à distance.

Bien que les prolongements que j'ai observés possèdent certaines caractéristiques des nanotubes, notamment en ce qui concerne les dimensions, il existe des différences fondamentales par rapport à ceux-ci. D'abord, les nanotubes ne peuvent se former que sous des conditions relativement stables et sont des structures d'apparence immobile (bien qu'un transfert de matériel puisse avoir lieu) et rectilignes. Or, les structures observées sont hautement mobiles et sont même difficiles à enregistrer avec des techniques de microscopie confocale classique. De plus, les nanotubes connectent les LT entre eux alors qu'à une exception près, les prolongements membranaires ne semblent pas connecter les LT entre eux. Ces distinctions fondamentales suggèrent l'observation d'extensions membranaires particulières, non encore décrites à ce jour.

Une particularité des LT CD8 observés *ex vivo* est leur caractère infiltrant le SNC. En effet, ces structures n'ont jamais été observées à la surface des LT purifiés de la périphérie des animaux infectés. Les LT CD8 infiltrants ont dû traverser la BHE afin de pénétrer dans le cerveau des rats infectés. Ce passage nécessite d'importants changements morphologiques du lymphocyte, suggérant une grande plasticité de son cytosquelette. Néanmoins, ces structures n'ont pas été décrites dans le modèle largement étudié de l'EAE, dans lequel les LT doivent pourtant traverser la BHE afin d'induire des dommages neuronaux. Toutefois, il a été décrit des LT CD8 infiltrants avec des prolongements membranaires, bien que bien plus courts, dans des lésions de patients atteints de la SEP (Serafini *et al.*, 2007). Il a également été récemment observé des LT CD8 antiviraux possédant des prolongements membranaires similaires (McDole *et al.*, 2010). De façon intéressante, cette observation a été faite dans un modèle d'infection du SNC par le TMEV. Il apparaît que les LT CD8 possédant ces "TCEP" (T Cell Extended Processes) ont une capacité migratoire plus importante que les lymphocytes de forme arrondie. Ces données récentes laissent supposer que ces prolongements sont peut être un caractère acquis des LT CD8 infiltrant le SNC.

Il serait nécessaire d'approfondir les observations de ces prolongements membranaires. Malheureusement, nous nous heurtons ici à des limites techniques dues à la difficulté d'enregistrer des mouvements rapides de structures microscopiques. Les récentes avancées technologiques de l'imagerie microscopique permettraient probablement une meilleure visualisation de ces phénomènes, à l'aide notamment de microscopie confocale rapide de type "spinning disk". Il serait également intéressant de déterminer si, comme cela a été publié pour les nanotubes de LT, ces prolongements contiennent de l'actine et sont dépendants de sa polymérisation pour leur mouvement. Pour cela, nous pourrions traiter les LT CD8 infiltrants à la cytochalasine B, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine, et observer si la proportion de LT CD8 possédant de ces prolongements est inchangée.

De plus, comme cité précédemment, les virus tels que HIV-1 mais aussi PRV (Favoreel *et al.*, 2005) ou HSV (La Boissière *et al.*, 2004) peuvent utiliser des projections membranaires (ou des nanotubes pour HIV-1) afin d'infecter les cellules alentour. Bien que les LT CD8 ne soient pas décrits comme étant une cible du BDV, il

faudrait confirmer que les LT CD8 ne sont pas infectés et que ce comportement de leur membrane n'est pas dû au virus, mais bien à d'autres caractéristiques propres, comme leur statut d'activation ou leur caractère infiltrant du SNC.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, N.J., Rönnbäck, L. & Hansson, E., 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(1), pp.41-53.
- Achim, C.L. & Wiley, C.A., 1992. Expression of major histocompatibility complex antigens in the brains of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 51(3), pp.257-63.
- Ackerman, A.L. & Cresswell, P., 2004. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nature immunology*, 5(7), pp.678-84.
- Alexopoulou, L et al., 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857), pp.732-8.
- Allmang, U. et al., 2001. Low avidity of human serum antibodies for Borna disease virus antigens questions their diagnostic value. *Molecular Psychiatry*, 6(3), pp.329-333.
- Aloisi, F, 1999. The role of microglia and astrocytes in CNS immune surveillance and immunopathology. *Advances in experimental medicine and biology*, 468, pp.123-33.
- Aloisi, F et al., 2000. Functional maturation of adult mouse resting microglia into an APC is promoted by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interaction with Th1 cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(4), pp.1705-12.
- Aloisi, F et al., 1998. Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 160(10), pp.4671-80.
- Alt, C., Laschinger, M. & Engelhardt, B., 2002. Functional expression of the lymphoid chemokines CCL19 (ELC) and CCL 21 (SLC) at the blood-brain barrier suggests their involvement in G-protein-dependent lymphocyte recruitment into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyeli. *European journal of immunology*, 32(8), pp.2133-44.
- Amsterdam, J.D. et al., 1985. Borna disease virus. A possible etiologic factor in human affective disorders? *Archives of general psychiatry*, 42(11), pp.1093-6.
- Antoniou, A.N. & Powis, S.J., 2008. Pathogen evasion strategies for the major histocompatibility complex class I assembly pathway. *Immunology*, 124(1), pp.1-12.
- Ayoub, A.E. & Salm, A.K., 2003. Increased morphological diversity of microglia in the activated hypothalamic supraoptic nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(21), pp.7759-66.

- Bacsó, Z. et al., 1996. Changes in membrane potential of target cells promotes cytotoxic activity of effector T lymphocytes. *Immunology letters*, 51(3), pp.175-80.
- Baldwin, R.L. et al., 1996. Structural changes of tumor necrosis factor alpha associated with membrane insertion and channel formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(3), pp.1021-6.
- Barber, D.L. et al., 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, 439(7077), pp.682-7.
- Bartholomäus, I. et al., 2009. Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature*, 462(7269), pp.94-8.
- Batten, M. et al., 2006. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nature immunology*, 7(9), pp.929-36.
- Bauer, J et al., 1998. T-cell apoptosis in inflammatory brain lesions: destruction of T cells does not depend on antigen recognition. *The American journal of pathology*, 153(3), pp.715-24.
- Baur, K. et al., 2008. Antiviral CD8 T cells recognize borna disease virus antigen transgenically expressed in either neurons or astrocytes. *Journal of virology*, 82(6), pp.3099-108.
- Bautista, J.R. et al., 1995. Developmental injury to the cerebellum following perinatal Borna disease virus infection. *Brain research. Developmental brain research*, 90(1-2), pp.45-53.
- Bautista, J.R. et al., 1994. Early and persistent abnormalities in rats with neonatally acquired Borna disease virus infection. *Brain research bulletin*, 34(1), pp.31-40.
- Bayer, S.A., 1980. Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. *The Journal of comparative neurology*, 190(1), pp.87-114.
- Bearer, E.L. et al., 2000. Retrograde axonal transport of herpes simplex virus: evidence for a single mechanism and a role for tegument. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14), pp.8146-50.
- Bechmann, I et al., 1999. FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia*, 27(1), pp.62-74.

- Bene, L. et al., 1997. Major histocompatibility complex class I protein conformation altered by transmembrane potential changes. *Cytometry*, 27(4), pp.353-7.
- Bennett, S.R. et al., 1998. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*, 393(6684), pp.478-80.
- Berg, A.L. & Berg, M., 1998. A variant form of feline Borna disease. *Journal of comparative pathology*, 119(3), pp.323-31.
- Bergmann, C C et al., 1999. Inverted immunodominance and impaired cytolytic function of CD8+ T cells during viral persistence in the central nervous system. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(6), pp.3379-87.
- Bergmann, Cornelia C, Lane, T.E. & Stohlman, Stephen A, 2006. Coronavirus infection of the central nervous system: host-virus stand-off. *Nature reviews. Microbiology*, 4(2), pp.121-32.
- Bettelli, E. et al., 1998. IL-10 Is Critical in the Regulation of Autoimmune Encephalomyelitis as Demonstrated by Studies of IL-10- and IL-4-Deficient and Transgenic Mice. *J. Immunol.*, 161(7), pp.3299-3306.
- Bieback, K. et al., 2002. Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *Journal of virology*, 76(17), pp.8729-36.
- Bien, C.G. et al., 2002. Destruction of neurons by cytotoxic T cells: a new pathogenic mechanism in Rasmussen's encephalitis. *Annals of neurology*, 51(3), pp.311-8.
- Billingham, R.E. & Boswell, T., 1953. Studies on the problem of corneal homografts. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)*, 141(904), pp.392-406.
- Binah, O, 2001. Pharmacologic modulation of the immune interaction between cytotoxic lymphocytes and ventricular myocytes. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 38(2), pp.298-316.
- Binah, O et al., 1992. Immunological rejection of heart transplant: how lytic granules from cytotoxic T lymphocytes damage guinea pig ventricular myocytes. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 420(2), pp.172-9.
- Binah, Ofer, 2002. Cytotoxic lymphocytes and cardiac electrophysiology. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 34(9), pp.1147-61.
- Binder, D. et al., 1998. Aplastic anemia rescued by exhaustion of cytokine-secreting CD8+ T cells in persistent infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *The Journal of experimental medicine*, 187(11), pp.1903-20.

- Bitsch, A et al., 2000. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain : a journal of neurology*, 123 (Pt 6, pp.1174-83.
- Bjurstöm, H. et al., 2008. GABA, a natural immunomodulator of T lymphocytes. *Journal of neuroimmunology*, 205(1-2), pp.44-50.
- Bode, L. et al., 1996. First isolates of infectious human Borna disease virus from patients with mood disorders. *Molecular psychiatry*, 1(3), pp.200-12.
- Booss, J. et al., 1983. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*, 62(1-3), pp.219-32.
- Borden, E.C., 2007. Augmentation of effects of interferon-stimulated genes by reversal of epigenetic silencing: potential application to melanoma. *Cytokine & growth factor reviews*, 18(5-6), pp.491-501.
- Borden, E.C. et al., 2007. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nature reviews. Drug discovery*, 6(12), pp.975-90.
- Borovikova, L.V. et al., 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 405(6785), pp.458-62.
- Boulton, M. et al., 1999. Contribution of extracranial lymphatics and arachnoid villi to the clearance of a CSF tracer in the rat. *The American journal of physiology*, 276(3 Pt 2), pp.R818-23.
- Boutros, T., Croze, E. & Yong, Voon Wee, 2002. Interferon- β Is a Potent Promoter of Nerve Growth Factor Production by Astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 69(3), pp.939-946.
- Bowie, A.G. & Haga, I.R., 2005. The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Molecular immunology*, 42(8), pp.859-67.
- Brahic, M. & Roussarie, J.-P., 2009. Axon-myelin interactions during a viral infection of the central nervous system. *PLoS pathogens*, 5(9), p.e1000519.
- Brandenburg, B. & Zhuang, X., 2007. Virus trafficking - learning from single-virus tracking. *Nature reviews. Microbiology*, 5(3), pp.197-208.
- Brannan, C.A. & Roberts, M.R., 2004. Resident microglia from adult mice are refractory to nitric oxide-inducing stimuli due to impaired NOS2 gene expression. *Glia*, 48(2), pp.120-31.

- Briese, T. et al., 1994. Genomic organization of Borna disease virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(10), pp.4362-6.
- Brisebois, M. et al., 2006. A pathogenic role for CD8⁺ T cells in a spontaneous model of demyelinating disease. *J. Immunol.*, 177, pp.2403-2411.
- Burdeinick-Kerr, R. & Griffin, Diane E, 2005. Gamma interferon-dependent, noncytolytic clearance of sindbis virus infection from neurons in vitro. *Journal of virology*, 79(9), pp.5374-85.
- Burdeinick-Kerr, R., Wind, J. & Griffin, Diane E, 2007. Synergistic roles of antibody and interferon in noncytolytic clearance of Sindbis virus from different regions of the central nervous system. *Journal of virology*, 81(11), pp.5628-36.
- Calzascia, T. et al., 2003. Cutting edge: cross-presentation as a mechanism for efficient recruitment of tumor-specific CTL to the brain. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(5), pp.2187-91.
- Calzascia, T. et al., 2005. Homing phenotypes of tumor-specific CD8 T cells are predetermined at the tumor site by crosspresenting APCs. *Immunity*, 22(2), pp.175-84.
- Caramalho, I. et al., 2008. Visualizing CTL/melanoma cell interactions: multiple hits must be delivered for tumor cell annihilation. *Journal of cellular and molecular medicine*, (33).
- Carbone, K M, Moench, T.R. & Lipkin, W.I., 1991. Borna disease virus replicates in astrocytes, Schwann cells and ependymal cells in persistently infected rats: location of viral genomic and messenger RNAs by in situ hybridization. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 50(3), pp.205-14.
- Carbone, K M et al., 1991. Borna disease: association with a maturation defect in the cellular immune response. *Journal of virology*, 65(11), pp.6154-64.
- Carbone, K M et al., 2001. Borna disease: virus-induced neurobehavioral disease pathogenesis. *Current opinion in microbiology*, 4(4), pp.467-75.
- Cardona, A.E. et al., 2006. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature neuroscience*, 9(7), pp.917-24.
- Caroline Sievers, Nick Platt, V. Hugh Perry, Michael P. Coleman, L.C., 2003. Neurites undergoing Wallerian degeneration show an apoptotic-like process with annexin V positive staining and loss of mitochondrial membrane potential. *Neuroscience Research*, 46(2), pp.161-169.

- Carrithers, M.D. et al., 2000. Differential adhesion molecule requirements for immune surveillance and inflammatory recruitment. *Brain : a journal of neurology*, 123 (Pt 6, pp.1092-101.
- Cayrol, C. & Girard, J., 2009. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 22(106), pp.9021-6.
- Chabot, S. & Yong, V W, 2000. Interferon beta-1b increases interleukin-10 in a model of T cell-microglia interaction: relevance to MS. *Neurology*, 55(10), pp.1497-505.
- Chalmers, R.M., Thomas, D.R. & Salmon, R.L., 2005. Borna disease virus and the evidence for human pathogenicity: a systematic review. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*, 98(4), pp.255-74.
- Chaudhuri, S. et al., 2009. Human cytomegalovirus interacts with toll-like receptor 2 and CD14 on syncytiotrophoblasts to stimulate expression of TNFalpha mRNA and apoptosis. *Placenta*, 30(11), pp.994-1001.
- Chauveau, A. et al., 2010. Membrane nanotubes facilitate long-distance interactions between natural killer cells and target cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(12), pp.5545-50.
- Chesler, D.A. & Reiss, C.S., 2002. The role of IFN-gamma in immune responses to viral infections of the central nervous system. *Cytokine & growth factor reviews*, 13(6), pp.441-54.
- Chinnery, H.R., Pearlman, E. & McMenamin, Paul G, 2008. Cutting edge: Membrane nanotubes in vivo: a feature of MHC class II+ cells in the mouse cornea. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(9), pp.5779-83.
- Choi, C. & Benveniste, E.N., 2004. Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain research. Brain research reviews*, 44(1), pp.65-81.
- Choi, C. et al., 1999. Fas Ligand and Fas Are Expressed Constitutively in Human Astrocytes and the Expression Increases with IL-1, IL-6, TNF- α , or IFN- γ . *J. Immunol.*, 162(4), pp.1889-1895.
- Chávez-Galán, L. et al., 2009. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cellular & molecular immunology*, 6(1), pp.15-25.
- Coleman, M., 2005. Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nature reviews. Neuroscience*, 6(11), pp.889-98.

- Compton, T. et al., 2003. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *Journal of virology*, 77(8), pp.4588-96.
- Correale, J. & Villa, A., 2008. Isolation and characterization of CD8+ regulatory T cells in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 195(1-2), pp.121-34.
- Corriveau, R. a, Huh, G.S. & Shatz, C.J., 1998. Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity. *Neuron*, 21(3), pp.505-20.
- Creagh, E.M. & O'Neill, L.A.J., 2006. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends in immunology*, 27(8), pp.352-7.
- Cubitt, B. & de la Torre, J C, 1994. Borna disease virus (BDV), a nonsegmented RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious BDV ribonucleoproteins are present. *Journal of virology*, 68(3), pp.1371-81.
- Cunningham, A.J. et al., 1996. Interleukin-1 beta (IL-1 beta) and tumour necrosis factor (TNF) inhibit long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. *Neuroscience letters*, 203(1), pp.17-20.
- Das, A. et al., 2008. Time-dependent increases in protease activities for neuronal apoptosis in spinal cords of Lewis rats during development of acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroscience research*, 86(13), pp.2992-3001.
- Dauphin, G. et al., 2002. Borna disease: current knowledge and virus detection in France. *Veterinary Research*, 33(2), pp.127-138.
- Davis, D.M., 2009. Mechanisms and functions for the duration of intercellular contacts made by lymphocytes. *Nature reviews. Immunology*, 9(8), pp.543-55.
- de la Torre, J C, 1994. Molecular biology of borna disease virus: prototype of a new group of animal viruses. *Journal of virology*, 68(12), pp.7669-75.
- de la Torre, J C et al., 1996. Sequence characterization of human Borna disease virus. *Virus research*, 44(1), pp.33-44.
- de La Torre, J.C. et al., 1996. Detection of borna disease virus antigen and RNA in human autopsy brain samples from neuropsychiatric patients. *Virology*, 223(2), pp.272-82.
- de la Torre, Juan Carlos, 2002. Bornavirus and the brain. *The Journal of infectious diseases*, 186 Suppl , pp.S241-7.

- de Saint Basile, G., Ménasché, G. & Fischer, A., 2010. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nature Reviews Immunology*, 10(8), pp.568-579.
- de Vos, A.F. et al., 2002. Transfer of Central Nervous System Autoantigens and Presentation in Secondary Lymphoid Organs. *J. Immunol.*, 169(10), pp.5415-5423.
- Delhaye, S. et al., 2006. Neurons produce type I interferon during viral encephalitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(20), pp.7835-40.
- Demotte, Nathalie et al., 2008. Restoring the association of the T cell receptor with CD8 reverses anergy in human tumor-infiltrating lymphocytes. *Immunity*, 28(3), pp.414-24.
- Demotte, N et al., 2002. A reversible functional defect of CD8 + T lymphocytes involving loss of tetramer labeling. *Eur. J. Immunol.*, 32, pp.1688-1697.
- Desbarats, Julie et al., 2003. Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nature cell biology*, 5(2), pp.118-25.
- Després, P., Griffin, J.W. & Griffin, D E, 1995. Effects of anti-E2 monoclonal antibody on sindbis virus replication in AT3 cells expressing bcl-2. *Journal of virology*, 69(11), pp.7006-14.
- Destombes, J. et al., 1997. Persistent poliovirus infection in mouse motoneurons. *Journal of virology*, 71(2), pp.1621-8.
- Diebold, S.S. et al., 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5663), pp.1529-31.
- Diefenbach, R.J. et al., 2002. Herpes simplex virus tegument protein US11 interacts with conventional kinesin heavy chain. *Journal of virology*, 76(7), pp.3282-91.
- Diefenbach, R.J. et al., 2008. Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. *Reviews in medical virology*, 18(1), pp.35-51.
- Dinesh, R.K. et al., 2010. CD8+ Tregs in lupus, autoimmunity, and beyond. *Autoimmunity reviews*, 9(8), pp.560-8.
- Dittrich, W. et al., 1989. Learning deficiencies in Borna disease virus-infected but clinically healthy rats. *Biological psychiatry*, 26(8), pp.818-28.
- Divito, S., Cherpes, T.L. & Hendricks, R.L., 2006. A triple entente: virus, neurons, and CD8+ T cells maintain HSV-1 latency. *Immunologic research*, 36(1-3), pp.119-26.

- Doom, C.M. & Hill, A.B., 2008. MHC class I immune evasion in MCMV infection. *Medical microbiology and immunology*, 197(2), pp.191-204.
- Dullforce, P.A. et al., 2004. APCs in the Anterior Uveal Tract Do Not Migrate to Draining Lymph Nodes. *J. Immunol.*, 172(11), pp.6701-6708.
- Duplan, V. et al., 2007. Tracking antigen-specific CD8+ T cells in the rat using MHC class I multimers. *Journal of immunological methods*, 320(1-2), pp.30-9.
- Duvernoy, H.M. & Risold, P.-Y., 2007. The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain research reviews*, 56(1), pp.119-47.
- Döhner, K. et al., 2002. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Molecular biology of the cell*, 13(8), pp.2795-809.
- Dörries, R., 2001. The role of T-cell-mediated mechanisms in virus infections of the nervous system. *Current topics in microbiology and immunology*, 253, pp.219-45.
- Dürrwald, R. & Ludwig, H., 1997. Borna disease virus (BDV), a (zoonotic?) worldwide pathogen. A review of the history of the disease and the virus infection with comprehensive bibliography. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B*, 44(3), pp.147-84.
- Ehrlich, P., 1885. Das Sauerstoff-Bedürfnis des Organismus. Eine farbenanalytische Studie. [On the oxygen consumption of the body. A study using intravital dyes.]. *Verlag von August Hirschwald, Berlin*.
- Eisenman, L.M. et al., 1999. Neonatal Borna disease virus infection in the rat causes a loss of Purkinje cells in the cerebellum. *Journal of neurovirology*, 5(2), pp.181-9.
- El-Bacha, R.S. & Minn, A., 1999. Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 45(1), pp.15-23.
- Eneroth, A. et al., 1992. Interferon-gamma-like immunoreactivity in sensory neurons may influence the replication of Sendai and mumps viruses. *Journal of neuroscience research*, 31(3), pp.487-93.
- Engelhardt, K.R. et al., 2005. The functional avidity of virus-specific CD8+ T cells is down-modulated in Borna disease virus-induced immunopathology of the central nervous system. *European journal of immunology*, 35(2), pp.487-97.

- Erkman, L. et al., 1989. Interferon induces astrocyte maturation causing an increase in cholinergic properties of cultured human spinal cord cells. *Developmental biology*, 132(2), pp.375-88.
- Erlandsson, L. et al., 1998. Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts. *Current biology : CB*, 8(4), pp.223-6.
- Esser, M.T. et al., 1998. Ca²⁺ signaling modulates cytolytic T lymphocyte effector functions. *The Journal of experimental medicine*, 187(7), pp.1057-67.
- Fabry, Z., Raine, C.S. & Hart, M.N., 1994. Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. *Immunology today*, 15(5), pp.218-24.
- Faix, J. & Rottner, K., 2006. The making of filopodia. *Current opinion in cell biology*, 18(1), pp.18-25.
- Fan, J., Bass, H.Z. & Fahey, J.L., 1993. Elevated IFN-gamma and decreased IL-2 gene expression are associated with HIV infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 151(9), pp.5031-40.
- Faustin, B. et al. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Molecular cell*, 5(25), pp.713-24.
- Favoreel, H.W. et al., 2005. Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by the US3 kinase of an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(25), pp.8990-5.
- Felzen, B. et al., 1994. Mechanisms whereby cytotoxic T lymphocytes damage guinea-pig ventricular myocytes in vitro. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 427(5-6), pp.422-31.
- Ferguson, B. et al., 1997. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain : a journal of neurology*, 120 (Pt 3), pp.393-9.
- Feschotte, C., 2010. News & views Bornavirus enters the genome. *Nature*, 463(January).
- Fink, S. & Cookson, B., 2006. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cellular Microbiology*, 8(11), pp.1812-25.
- Fischer, H.-G., Bonifas, U. & Reichmann, G., 2000. Phenotype and Functions of Brain Dendritic Cells Emerging During Chronic Infection of Mice with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*, 164(9), pp.4826-4834.

- Fitzgerald, D.C. et al., 2007. Suppressive Effect of IL-27 on Encephalitogenic Th17 Cells and the Effector Phase of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 179(5), pp.3268-3275.
- Fleming, J.O. et al., 1989. Monoclonal antibodies to the matrix (E1) glycoprotein of mouse hepatitis virus protect mice from encephalitis. *Virology*, 168(1), pp.162-7.
- Flügel, A et al., 2001. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity*, 14(5), pp.547-60.
- Ford, M.L., Evavold, B.D. & Specificity, M., 2005. Specificity, magnitude, and kinetics of MOG-specific CD8+ T cell responses during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol*, 35, pp.76-85.
- Frei, K. et al., 1987. Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells. *European journal of immunology*, 17(9), pp.1271-8.
- Friedl, G. et al., 2004. Borna disease virus multiplication in mouse organotypic slice cultures is site-specifically inhibited by gamma interferon but not by interleukin-12. *Journal of virology*, 78(3), pp.1212-8.
- Frumento, G. et al., 2002. Tryptophan-derived Catabolites Are Responsible for Inhibition of T and Natural Killer Cell Proliferation Induced by Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Journal of Experimental Medicine*, 196(4), pp.459-468.
- Fujinami, R.S. et al., 1989. Survival of athymic (nu/nu) mice after Theiler's murine encephalomyelitis virus infection by passive administration of neutralizing monoclonal antibody. *Journal of virology*, 63(5), pp.2081-7.
- Galea, I. et al., 2007. An antigen-specific pathway for CD8 T cells across the blood-brain barrier. *The Journal of experimental medicine*, 204(9), pp.2023-30.
- Gies, U. et al., 2001. Cortical cholinergic decline parallels the progression of Borna virus encephalitis. *Neuroreport*, 12(17), pp.3767-72.
- Gitlin, L. et al., 2006. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(22), pp.8459-64.
- Giuliani, F. et al., 2003. Vulnerability of Human Neurons to T Cell-Mediated Cytotoxicity. *J. Immunol.*, 171(1), pp.368-379.
- Goldmann, E., 1913. Vitalfärbungen am Zentralnervensystem. Beitrag zur Physiopathologie des Plexus Choroideus und der Hirnhäute. [Intravital labelling of the

- central nervous system. A study on the pathophysiology of the choroid plexus and the meninges.]. *Abhandlungen der königlich preußischen Akademie der Wissenschaften. Physikalisch-Mathematische*, 1, p.1–64.
- Gonzalez-Dunia, D et al., 1997. Characterization of Borna disease virus p56 protein, a surface glycoprotein involved in virus entry. *Journal of virology*, 71(4), pp.3208-18.
- Gonzalez-Dunia, D et al., 1996. Expression of tissue factor is increased in astrocytes within the central nervous system during persistent infection with borna disease virus. *Journal of virology*, 70(9), pp.5812-20.
- Gonzalez-Dunia, D, Sauder, C & de la Torre, J C, 1997. Borna disease virus and the brain. *Brain research bulletin*, 44(6), pp.647-64.
- Gonzalez-Dunia, D et al., 2000. Synaptic pathology in Borna disease virus persistent infection. *Journal of virology*, 74(8), pp.3441-8.
- Gonzalez-Dunia, Daniel et al., 2005. Borna disease virus interference with neuronal plasticity. *Virus research*, 111(2), pp.224-34.
- Gousset, K. et al., 2009. Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nature cell biology*, 11(3), pp.328-36.
- Goverman, J, 2009. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.*, 9, pp.393-407.
- Greter, M. et al., 2005. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat. Med*, 11, pp.328-334.
- Griffin, Diane E, 2003. Immune responses to RNA-virus infections of the CNS. *Nature reviews. Immunology*, 3(6), pp.493-502.
- Gu, Y. et al., 1997. Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science (New York, NY)*, 275 (5297), pp.206-9.
- Gurcel, L. et al., 2006. Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promote cell survival. *Cell*, 6(126), pp.1135-45.
- Guyton, M.K. et al., 2005. Upregulation of calpain correlates with increased neurodegeneration in acute experimental auto-immune encephalomyelitis. *Journal of neuroscience research*, 81(1), pp.53-61.
- Hagiwara, K et al., 2000. Detection of Borna disease virus in a pregnant mare and her fetus. *Veterinary microbiology*, 72(3-4), pp.207-16.

- Hagiwara, Katsuro et al., 2008. Borna disease virus RNA detected in Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *Primates; journal of primatology*, 49(1), pp.57-64.
- Hahn, S., Gehri, R. & Erb, P., 1995. Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity. *Immunological reviews*, 146, pp.57-79.
- Hallensleben, W. et al., 1998. Borna disease virus-induced neurological disorder in mice: infection of neonates results in immunopathology. *Journal of virology*, 72(5), pp.4379-86.
- Hangartner, L., Zinkernagel, Rolf M & Hengartner, Hans, 2006. Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nature reviews. Immunology*, 6(3), pp.231-43.
- Haring, J.S., Pewe, L.L. & Perlman, S., 2001. High-magnitude, virus-specific CD4 T-cell response in the central nervous system of coronavirus-infected mice. *Journal of virology*, 75(6), pp.3043-7.
- Harling-Berg, C.J., Knopf, P.M. & Cserr, H.F., 1991. Myelin basic protein infused into cerebrospinal fluid suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*, 35(1-3), pp.45-51.
- Harling-Berg, C.J., Park, T.J. & Knopf, P.M., 1999. Role of the cervical lymphatics in the Th2-type hierarchy of CNS immune regulation. *Journal of neuroimmunology*, 101(2), pp.111-27.
- Hasbani, M.J. et al., 1998. Distinct roles for sodium, chloride, and calcium in excitotoxic dendritic injury and recovery. *Experimental neurology*, 154(1), pp.241-58.
- Hatalski, C.G., Hickey, W.F. & Lipkin, W.I., 1998. Humoral immunity in the central nervous system of Lewis rats infected with Borna disease virus. *Journal of neuroimmunology*, 90(2), pp.128-36.
- Hatterer, E. et al., 2006. How to drain without lymphatics? Dendritic cells migrate from the cerebrospinal fluid to the B-cell follicles of cervical lymph nodes. *Blood*, 107(2), pp.806-12.
- Hauser, S.L. et al., 1986. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology*, 19(6), pp.578-87.
- Hausmann, Jürgen et al., 2005. Vaccine-induced protection against Borna disease in wild-type and perforin-deficient mice. *The Journal of general virology*, 86(Pt 2), pp.399-403.

- Hausmann, Jürgen et al., 2005. CD8 T cells require gamma interferon to clear borna disease virus from the brain and prevent immune system-mediated neuronal damage. *Journal of virology*, 79(21), pp.13509-18.
- Hausmann, Jürgen et al., 2004. Neurological disorder after Borna disease virus infection in the absence of either interferon-gamma, Fas, inducible NO synthase, or chemokine receptor CXCR3. *Viral immunology*, 17(1), pp.79-85.
- Hawke, S. et al., 1998. Long-term persistence of activated cytotoxic T lymphocytes after viral infection of the central nervous system. *The Journal of experimental medicine*, 187(10), pp.1575-82.
- Hawkins, B.T. & Davis, T.P., 2005. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological reviews*, 57(2), pp.173-85.
- Heath, W.R. & Carbone, F R, 2001. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annual review of immunology*, 19, pp.47-64.
- Heil, F. et al., 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5663), pp.1526-9.
- Henderson, A.P.D. et al., 2009. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Annals of neurology*, 66(6), pp.739-53.
- Herzog, S., Frese, K. & Rott, R., 1991. Studies on the genetic control of resistance of black hooded rats to Borna disease. *The Journal of general virology*, 72 (Pt 3), pp.535-40.
- Herzog, S. et al., 1985. Effect of Borna disease virus infection on athymic rats. *The Journal of general virology*, 66 (Pt 3), pp.503-8.
- Hess, D.C. et al., 1993. Cognitive and neurologic deficits in the MRL/lpr mouse: a clinicopathologic study. *The Journal of rheumatology*, 20(4), pp.610-7.
- Hickey, W.F., 1999. Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Seminars in immunology*, 11(2), pp.125-37.
- Hikawa, N. et al., 1997. Delayed neurite regeneration and its improvement by nerve growth factor (NGF) in dorsal root ganglia from MRL-lpr/lpr mice in vitro. *Journal of the neurological sciences*, 149(1), pp.13-7.
- Hilbe, Monika et al., 2006. Shrews as reservoir hosts of borna disease virus. *Emerging infectious diseases*, 12(4), pp.675-7.
- Hirano, N., Kao, M. & Ludwig, H, 1983. Persistent, tolerant or subacute infection in Borna disease virus-infected rats. *The Journal of general virology*, 64 (Pt 7), pp.1521-30.

- Hobom, M. et al., 2004. Mechanisms and time course of neuronal degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 14(2), pp.148-57.
- Hoek, R.M. et al., 2000. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science (New York, N.Y.)*, 290(5497), pp.1768-71.
- Horie, M. et al., 2010. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature*, 463(7277), pp.84-7.
- Hornig, M. et al., 1999. An infection-based model of neurodevelopmental damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(21), pp.12102-7.
- Hornung, V. et al., 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5801), pp.994-7.
- Hornung, V. et al., 2009. AIM2 recognizes dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature*, 458(7237), pp.514-8.
- Howe, C.L. et al., 2007. CD8+ T cells directed against a viral peptide contribute to loss of motor function by disrupting axonal transport in a viral model of fulminant demyelination. *Journal of neuroimmunology*, 188(1-2), pp.13-21.
- Huseby, E.S. et al., 2001. A Pathogenic Role for Myelin-specific CD8. *Autoimmunity*, 194(5).
- Höftberger, R. et al., 2004. Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 14(1), pp.43-50.
- Ichimura, T., Fraser, P.A. & Cserr, H.F., 1991. Distribution of extracellular tracers in perivascular spaces of the rat brain. *Brain research*, 545(1-2), pp.103-13.
- Ip, C.W. et al., 2006. Immune cells contribute to myelin degeneration and axonopathic changes in mice overexpressing proteolipid protein in oligodendrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(31), pp.8206-16.
- Irani, D.N., 1998. The susceptibility of mice to immune-mediated neurologic disease correlates with the degree to which their lymphocytes resist the effects of brain-derived gangliosides. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(6), pp.2746-52.
- Irani, D.N. & Griffin, D E, 1991. Isolation of brain parenchymal lymphocytes for flow cytometric analysis. Application to acute viral encephalitis. *Journal of immunological methods*, 139(2), pp.223-31.

- Irani, D.N. & Griffin, D E, 1996. Regulation of lymphocyte homing into the brain during viral encephalitis at various stages of infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 156(10), pp.3850-7.
- Irani, D.N., Lin, K.I. & Griffin, D E, 1996. Brain-derived gangliosides regulate the cytokine production and proliferation of activated T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 157(10), pp.4333-40.
- Ireland, D.D.C. et al., 2008a. Type I interferons are essential in controlling neurotropic coronavirus infection irrespective of functional CD8 T cells. *Journal of virology*, 82(1), pp.300-10.
- Ireland, D.D.C. et al., 2008b. Type I interferons are essential in controlling neurotropic coronavirus infection irrespective of functional CD8 T cells. *Journal of virology*, 82(1), pp.300-10.
- Ishii, K.J. et al., 2006. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nature immunology*, 7(1), pp.40-8.
- Itagaki, S., McGeer, P.L. & Akiyama, H., 1988. Presence of T-cytotoxic suppressor and leucocyte common antigen positive cells in Alzheimer's disease brain tissue. *Neuroscience letters*, 91(3), pp.259-64.
- Iwasaki, A. & Medzhitov, Ruslan, 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology*, 5(10), pp.987-95.
- Jacobs, B.L. & Langland, J.O., 1996. When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology*, 219(2), pp.339-49.
- Johnson, A J et al., 2001. Preservation of motor function by inhibition of CD8+ virus peptide-specific T cells in Theiler's virus infection. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(14), pp.2760-2.
- Joly, E. et al., 1991. Viral persistence in neurons explained by lack of major histocompatibility class I expression. *Science (New York, N.Y.)*, 253, pp. 1283-5.
- Jonakait, G.M. et al., 1994. Interferon-gamma promotes cholinergic differentiation of embryonic septal nuclei and adjacent basal forebrain. *Neuron*, 12(5), pp.1149-59.
- Junker, A. et al., 2007. Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain : a journal of neurology*, 130(Pt 11), pp.2789-99.

- Jurewicz, A. et al., 1998. MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes. *J. Immunology*, 160, pp. 3056-3059.
- Kagan, B.L. et al., 1992. Formation of ion-permeable channels by tumor necrosis factor-alpha. *Science (New York, N.Y.)*, 255(5050), pp.1427-30.
- Kagan, B.L. et al., 1993. The role of channel formation in the mechanism of action of tumor necrosis factors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 707, pp.317-27.
- Kageyama, S. et al., 1995. Variations in the number of peptide-MHC class I complexes required to activate cytotoxic T cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 154(2), pp.567-76.
- Kao, M., Ludwig, H & Gosztanyi, G., 1984. Adaptation of Borna disease virus to the mouse. *The Journal of general virology*, 65 Pt 10, pp.1845-9.
- Kataoka, T. et al., 1996. Estimation of pH and the number of lytic granules in a CD8+ CTL clone treated with an inhibitor of vacuolar type H(+)-ATPase concanamycin A. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 60(10), pp.1729-31.
- Kataoka, T. et al., 1994. Acidification is essential for maintaining the structure and function of lytic granules of CTL. Effect of concanamycin A, an inhibitor of vacuolar type H(+)-ATPase, on CTL-mediated cytotoxicity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 153(9), pp.3938-47.
- Kato, H. et al., 2006. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 441(7089), pp.101-5.
- Kawakami, N. et al., 2005. Live imaging of effector cell trafficking and autoantigen recognition within the unfolding autoimmune encephalomyelitis lesion. *The Journal of experimental medicine*, 201(11), pp.1805-14.
- Keller, M. et al. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell*, 132(5), pp.818-31.
- Kessler, B. et al., 1998. Peptide modification or blocking of CD8, resulting in weak TCR signaling, can activate CTL for Fas- but not perforin-dependent cytotoxicity or cytokine production. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(12), pp.6939-46.
- Kida, S., Pantazis, A. & Weller, R.O., 1993. CSF drains directly from the subarachnoid space into nasal lymphatics in the rat. Anatomy, histology and immunological significance. *Neuropathology and applied neurobiology*, 19(6), pp.480-8.

- Kimura, T. & Griffin, D E, 2000. The role of CD8(+) T cells and major histocompatibility complex class I expression in the central nervous system of mice infected with neurovirulent Sindbis virus. *Journal of virology*, 74(13), pp.6117-25.
- Kistler, A.L. et al., 2008. Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent. *Virology journal*, 5, p.88.
- Kleinschek, M.A. et al., 2007. IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine*, 204(1), pp.161-70.
- Knickelbein, J.E. et al., 2008. Noncytotoxic lytic granule-mediated CD8+ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5899), pp.268-71.
- Kobayashi, T et al., 1998. Nuclear targeting activity associated with the amino terminal region of the Borna disease virus nucleoprotein. *Virology*, 243(1), pp.188-97.
- Kraus, I. et al., 2005. Oligomerization and assembly of the matrix protein of Borna disease virus. *FEBS letters*, 579(12), pp.2686-92.
- Kristensson, K et al., 1994. Co-induction of neuronal interferon-gamma and nitric oxide synthase in rat motor neurons after axotomy: a role in nerve repair or death? *Journal of neurocytology*, 23(8), pp.453-9.
- Kuhlmann, Tanja et al., 2002. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain : a journal of neurology*, 125(Pt 10), pp.2202-12.
- Kumar, A. et al., 1994. Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(14), pp.6288-92.
- Kurts, C. et al., 1997. CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*, 186(12), pp.2057-62.
- Kurts, C. et al., 1998. Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *The Journal of experimental medicine*, 188(2), pp.409-14.
- Kwidzinski, E. et al., 2005. Indolamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation. *The FASEB journal : official*

publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 19(10), pp.1347-9.

Kägi, D. et al., 1996. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annual review of immunology*, 14, pp.207-32.

Kägi, D. et al., 1994. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5171), pp.528-30.

Körner, H. et al., 1991. Nucleocapsid or spike protein-specific CD4+ T lymphocytes protect against coronavirus-induced encephalomyelitis in the absence of CD8+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 147(7), pp.2317-23.

La Boissière, S. et al., 2004. Compartmentalization of VP16 in cells infected with recombinant herpes simplex virus expressing VP16-green fluorescent protein fusion proteins. *Journal of virology*, 78(15), pp.8002-14.

Lafon, M., 2005. Rabies virus receptors. *Journal of neurovirology*, 11(1), pp.82-7.

Lafon, M. et al., 2008. Detrimental Contribution of the Immuno-Inhibitor B7-H1 to Rabies Virus Encephalitis. *J. Immunol.*, 180(11), pp.7506-7515.

Lafon, M. et al., 2006. The innate immune facet of brain: human neurons express TLR-3 and sense viral dsRNA. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 29(3), pp.185-94.

Lamb, R.A., and Krug, R.M., 2001. *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*. In *Fields Virology* Philadelph., D. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, and S.E. Straus.

Lambert, C., Landau, A.M. & Desbarats, J, 2003. Fas — Beyond Death : A regenerative role for Fas in the nervous system Fas : The molecule. *Apoptosis*, 8(6), pp.551-562.

Lampson, L., 1995. Interpreting MHC class I/class II reciprocity in the CNS: reconciling divergent findings. *Microscopy research and technique*, 32, pp.267-85.

Lau, L.T. & Yu, A.C., 2001. Astrocytes produce and release interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma following traumatic and metabolic injury. *Journal of neurotrauma*, 18(3), pp.351-9.

Lee, Y.-H. et al., 2008. Essential role of CD8+CD122+ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(2), pp.825-32.

- Levine, B. et al., 1991. Antibody-mediated clearance of alphavirus infection from neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 254(5033), pp.856-60.
- Lewandowski, M., 1900. Zur Lehre von der Cerebrospinalflüssigkeit. [On the cerebrospinal fluid.]. *Z. Klein Forsch*, 40, p.480–494.
- Lewis, P., Fu, Y. & Lentz, T.L., 2000. Rabies virus entry at the neuromuscular junction in nerve-muscle cocultures. *Muscle & nerve*, 23(5), pp.720-30.
- Li, A.J. et al., 1997. Interleukin-6 inhibits long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain research*, 748(1-2), pp.30-8.
- Li, Q. et al., 1999. Increased expression of nitric oxide synthase and dendritic injury in simian immunodeficiency virus encephalitis. *Journal of human virology*, 2(3), pp.139-45.
- Lieberman, A.P. et al., 1989. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(16), pp.6348-52.
- Lin, M.T., Hinton, D R & Stohlman, S A, 1998. Mechanisms of viral clearance in perforin-deficient mice. *Advances in experimental medicine and biology*, 440, pp.431-6.
- Lin, M.T., Stohlman, S A & Hinton, D R, 1997. Mouse hepatitis virus is cleared from the central nervous systems of mice lacking perforin-mediated cytolysis. *Journal of virology*, 71(1), pp.383-91.
- Liu, Y. et al., 2006. Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE. *Nature medicine*, 12(5), pp.518-25.
- Logan, A. et al., 1992. Enhanced expression of transforming growth factor beta 1 in the rat brain after a localized cerebral injury. *Brain research*, 587(2), pp.216-25.
- Lowin, B. et al., 1994. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature*, 370(6491), pp.650-2.
- Ludwig, H & Bode, L., 2000. Borna disease virus: new aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 19(1), pp.259-88.
- Ludwig, H, Bode, L. & Gosztonyi, G., 1988. Borna disease: a persistent virus infection of the central nervous system. *Progress in medical virology. Fortschritte der medizinischen Virusforschung. Progrès en virologie médicale*, 35, pp.107-51.

- Lund, J.M. et al., 2004. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(15), pp.5598-603.
- Lundgren, A.L. et al., 1995. Staggering disease in cats: isolation and characterization of the feline Borna disease virus. *The Journal of general virology*, 76 (Pt 9), pp.2215-22.
- Luo, J. et al., 2007. Glia-dependent TGF-beta signaling, acting independently of the TH17 pathway, is critical for initiation of murine autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of clinical investigation*, 117(11), pp.3306-15.
- Lynch, M.A., 2004. Long-term potentiation and memory. *Physiological reviews*, 84(1), pp.87-136.
- Magnus, T. et al., 2005. Microglial expression of the B7 family member B7 homolog 1 confers strong immune inhibition: implications for immune responses and autoimmunity in the CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(10), pp.2537-46.
- Malik, T.H., Kishi, M. & Lai, P.K., 2000. Characterization of the P protein-binding domain on the 10-kilodalton protein of Borna disease virus. *Journal of virology*, 74(7), pp.3413-7.
- Malipiero, U. et al., 1999. Involvement of the N-methyl-D-aspartate receptor in neuronal cell death induced by cytotoxic T cell-derived secretory granules. *European journal of immunology*, 29(10), pp.3053-62.
- Manning, P.T. et al., 1987. MHC-specific cytotoxic T lymphocyte killing of dissociated sympathetic neuronal cultures. *The American journal of pathology*, 128(3), pp.395-409.
- Marten, N.W. et al., 2000. Contributions of CD8+ T cells and viral spread to demyelinating disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(8), pp.4080-8.
- Marten, N.W., Stohlman, S A & Bergmann, C C, 2000. Role of viral persistence in retaining CD8+ T cells within the central nervous system. *Journal of virology*, 74(17), pp.7903-10.
- Marten, N.W. et al., 1999. Selection of CD8+ T cells with highly focused specificity during viral persistence in the central nervous system. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(7), pp.3905-14.
- Martinon, F. et al. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-1beta. *Molecular cell*, 10(2), pp.417-26.

- Maslah, E. et al., 1997. Dendritic injury is a pathological substrate for human immunodeficiency virus-related cognitive disorders. HNRC Group. The HIV Neurobehavioral Research Center. *Annals of neurology*, 42(6), pp.963-72.
- Massa, P.T., 1993. Specific suppression of major histocompatibility complex class I and class II genes in astrocytes by brain-enriched gangliosides. *The Journal of experimental medicine*, 178(4), pp.1357-63.
- Matsumoto, M. et al., 2002. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochemical and biophysical research communications*, 293(5), pp.1364-9.
- Matyszak, M.K. & Perry, V H, 1995. Demyelination in the central nervous system following a delayed-type hypersensitivity response to bacillus Calmette-Guérin. *Neuroscience*, 64(4), pp.967-77.
- Matyszak, M.K. & Perry, V H, 1996. The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system. *Neuroscience*, 74(2), pp.599-608.
- Mayer, D. et al., 2005. Borna disease virus replication in organotypic hippocampal slice cultures from rats results in selective damage of dentate granule cells. *Journal of virology*, 79(18), pp.11716-23.
- McDole, J.R. et al., 2010. Rapid formation of extended processes and engagement of Theiler's virus-infected neurons by CNS-infiltrating CD8 T cells. *The American journal of pathology*, 177(4), pp.1823-33.
- McGavern, Dorian B. & Kang, S.S., 2011. Illuminating viral infections in the nervous system. *Nature Reviews Immunology*, 11(5), pp.318-329.
- McLaurin, J., Antel, J P & Yong, V W, 1995. Immune and non-immune actions of interferon-beta-1b on primary human neural cells. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 1(1), pp.10-9.
- McMenamin, P G, 1999. Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations. *The Journal of comparative neurology*, 405(4), pp.553-62.
- McPherson, S.W. et al., 2006. Bystander killing of neurons by cytotoxic T cells specific for a glial antigen. *Glia*, 53(5), pp.457-66.
- Medana, I M et al., 2000. MHC class I-restricted killing of neurons by virus-specific CD8+ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway. *Eur. J. Immunol.*, 30, pp.3623-3633.

- Medana, I. et al., 2001. Fas Ligand (CD95L) Protects Neurons Against Perforin-Mediated T Lymphocyte Cytotoxicity. *J. Immunol.*, 167(2), pp.674-681.
- Medawar, P.B., 1948. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *British journal of experimental pathology*, 29(1), pp.58-69.
- Melzer, N., Meuth, S.G. & Wiendl, H., 2009. CD8+ T cells and neuronal damage: direct and collateral mechanisms of cytotoxicity and impaired electrical excitability. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(11), pp.3659-73.
- Ménager, P. et al., 2009. Toll-like receptor 3 (TLR3° plays a role in the formation of rabies virus Negri bodies. *Plos Pathogens*, 5.
- Meuth, S.G. et al., 2009. Cytotoxic CD8+ T cell-neuron interactions: perforin-dependent electrical silencing precedes but is not causally linked to neuronal cell death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(49), pp.15397-409.
- Meuth, S.G. et al., 2008. CNS inflammation and neuronal degeneration is aggravated by impaired CD200-CD200R-mediated macrophage silencing. *Journal of neuroimmunology*, 194(1-2), pp.62-9.
- Meyer, R. et al., 2001. Acute neuronal apoptosis in a rat model of multiple sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(16), pp.6214-20.
- Misgeld, Thomas & Kerschensteiner, M., 2006. In vivo imaging of the diseased nervous system. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(6), pp.449-63.
- Mizuno, T. et al., 2008. Interferon-gamma directly induces neurotoxicity through a neuron specific, calcium-permeable complex of IFN-gamma receptor and AMPA GluR1 receptor. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(6), pp.1797-806.
- Mogensen, T.H., 2009. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clinical Microbiology Review*, 22 (2), pp 240-73.
- Morales, J.A. et al., 1988. Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Medical microbiology and immunology*, 177(2), pp.51-68.
- Mott, R.T. et al., 2004. Neuronal expression of CD22: novel mechanism for inhibiting microglial proinflammatory cytokine production. *Glia*, 46(4), pp.369-79.

- Mueller, C.A. et al., 2003. Accumulation of the proinflammatory cytokine endothelial-monocyte-activating polypeptide II in ramified microglial cells in brains of Borna virus infected Lewis rats. *Neuroscience letters*, 339(3), pp.215-8.
- Murphy, J.B. & Sturm, E., 1923. Conditions determining the transplantability of tissues in the brain. *The Journal of experimental medicine*, 38(2), pp.183-97.
- Murray, P.D. et al., 1998. Perforin-dependent neurologic injury in a viral model of multiple sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(18), pp.7306-14.
- Na, S.-Y. et al., 2008. Naive CD8 T-cells initiate spontaneous autoimmunity to a sequestered model antigen of the central nervous system. *Brain : a journal of neurology*, 131(Pt 9), pp.2353-65.
- Nakamura, Y. et al., 1995. Demonstration of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells from healthy horses in Japan. *Vaccine*, 13(12), pp.1076-9.
- Nakamura, Y. et al., 2000. Isolation of Borna disease virus from human brain tissue. *Journal of virology*, 74(10), pp.4601-11.
- Narayan, O. et al., 1983a. Behavioral disease in rats caused by immunopathological responses to persistent borna virus in the brain. *Science (New York, N.Y.)*, 220(4604), pp.1401-3.
- Narayan, O. et al., 1983b. Pathogenesis of Borna disease in rats: immune-mediated viral ophthalmoencephalopathy causing blindness and behavioral abnormalities. *The Journal of infectious diseases*, 148(2), pp.305-15.
- Neumann, H, 2001. Control of glial immune function by neurons. *Glia*, 36(2), pp.191-9.
- Neumann, H et al., 1998. Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(10), pp.5779-84.
- Neumann, H et al., 1997. Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. *The Journal of experimental medicine*, 185(2), pp.305-16.
- Neumann, Harald et al., 1995. Induction of MHC class I genes in neurons. *Science*, 269(July), pp.3-6.

- Neumann, Harald et al., 2002. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends in neurosciences*, 25(6), pp.313-9.
- Neumann, P. et al., 2009. Crystal structure of the Borna disease virus matrix protein (BDV-M) reveals ssRNA binding properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(10), pp.3710-5.
- Neuwelt, E. a et al., 2011. Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nature reviews. Neuroscience*, 12(3), pp.169-82.
- Nguyen, M.D., Julien, J.-P. & Rivest, S., 2002. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nature reviews. Neuroscience*, 3(3), pp.216-27.
- Nieder Korn, J.Y., 2008. Emerging concepts in CD8(+) T regulatory cells. *Current opinion in immunology*, 20(3), pp.327-31.
- Nikić, I. et al., 2011. A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nature medicine*, 17(4), pp.495-9.
- Nowotny, N et al., 2000. Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus. *Journal of virology*, 74(12), pp.5655-8.
- Nöske, K. et al., 1998. Virus-specific CD4+ T cells eliminate borna disease virus from the brain via induction of cytotoxic CD8+ T cells. *Journal of virology*, 72(5), pp.4387-95.
- Obermajer, N. et al., 2009. Cathepsin X-mediated beta2 integrin activation results in nanotube outgrowth. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(6), pp.1126-34.
- Ohka, S. et al., 1998. Retrograde transport of intact poliovirus through the axon via the fast transport system. *Virology*, 250(1), pp.67-75.
- Ohtaki, N. et al., 2007. Downregulation of an astrocyte-derived inflammatory protein, S100B, reduces vascular inflammatory responses in brains persistently infected with Borna disease virus. *Journal of virology*, 81(11), pp.5940-8.
- Okabe, Y. et al., 2005. Toll-like receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation. *The Journal of experimental medicine*, 202(10), pp.1333-9.
- Okamoto, M et al., 2003. Experimental vertical transmission of Borna disease virus in the mouse. *Archives of virology*, 148(8), pp.1557-68.
- Olson, J.K. & Miller, Stephen D, 2009. The innate immune response affects the development of the autoimmune response in Theiler's virus-induced

- demyelinating disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(9), pp.5712-22.
- Onfelt, B. et al., 2006. Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177(12), pp.8476-83.
- Oliveira, A. et al., 2004. A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *Proceedings of the National Association of Sciences of the United States of America*, 101, pp.17843-8
- Onfelt, B. et al., 2005. Long-distance calls between cells connected by tunneling nanotubules. *Science s STKE : signal transduction knowledge environment*, 2005(313), p.pe55.
- Ortler, S. et al., 2008. B7-H1 restricts neuroantigen-specific T cell responses and confines inflammatory CNS damage: implications for the lesion pathogenesis of multiple sclerosis. *European journal of immunology*, 38(6), pp.1734-44.
- Ousman, S.S., Wang, Jianping & Campbell, Iain L, 2005. Differential regulation of interferon regulatory factor (IRF)-7 and IRF-9 gene expression in the central nervous system during viral infection. *Journal of virology*, 79(12), pp.7514-27.
- Palma, J.P. et al., 2003. Infection with Theiler's murine encephalomyelitis virus directly induces proinflammatory cytokines in primary astrocytes via NF-kappaB activation: potential role for the initiation of demyelinating disease. *Journal of virology*, 77(11), pp.6322-31.
- Pardo, J. et al., 2003. Differential implication of protein kinase C isoforms in cytotoxic T lymphocyte degranulation and TCR-induced Fas ligand expression. *International Immunology*, 15(12), pp.1441-1450.
- Pardridge, W.M. et al., 1990. Comparison of in vitro and in vivo models of drug transcytosis through the blood-brain barrier. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 253(2), pp.884-91.
- Parra, B. et al., 1997. Kinetics of cytokine mRNA expression in the central nervous system following lethal and nonlethal coronavirus-induced acute encephalomyelitis. *Virology*, 233(2), pp.260-70.
- Parra, B. et al., 1999. IFN-gamma is required for viral clearance from central nervous system oligodendroglia. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(3), pp.1641-7.
- Parra, B. et al., 2000. Contributions of Fas-Fas ligand interactions to the pathogenesis of mouse hepatitis virus in the central nervous system. *Journal of virology*, 74(5), pp.2447-50.

- Pashenkov, M., 2001. Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain*, 124(3), pp.480-492.
- Pashenkov, Mikhail et al., 2002. Recruitment of dendritic cells to the cerebrospinal fluid in bacterial neuroinfections. *Journal of neuroimmunology*, 122(1-2), pp.106-16.
- Patterson, C.E., Daley, J.K. & Rall, Glenn F, 2002. Neuronal survival strategies in the face of RNA viral infection. *The Journal of infectious diseases*, 186 Suppl , pp.S215-9.
- Paul, S. et al., 2007. Type I interferon response in the central nervous system. *Biochimie*, 89(6-7), pp.770-8.
- Peng, G. et al., 2008. Borna disease virus P protein affects neural transmission through interactions with gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein. *Journal of virology*, 82(24), pp.12487-97.
- Perez, M et al., 2001. N-terminal domain of Borna disease virus G (p56) protein is sufficient for virus receptor recognition and cell entry. *Journal of virology*, 75(15), pp.7078-85.
- Perez, Mar & de la Torre, Juan Carlos, 2005. Identification of the Borna disease virus (BDV) proteins required for the formation of BDV-like particles. *The Journal of general virology*, 86(Pt 7), pp.1891-5.
- Perry, L.L. & Lodmell, D.L., 1991. Role of CD4+ and CD8+ T cells in murine resistance to street rabies virus. *Journal of virology*, 65(7), pp.3429-34.
- Peterson, J.W. et al., 2001. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology*, 50(3), pp.389-400.
- Pettmann, B. & Henderson, C.E., 2003. Killer wiles: growing interest in Fas. *Nature cell biology*, 5(2), pp.91-2.
- Piccio, L. et al., 2002. Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric G(i)-linked receptors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(4), pp.1940-9.
- Pichlmair, A. & Reis e Sousa, C., 2007. Innate recognition of viruses. *Immunity*, 27(3), pp.370-83.
- Pichlmair, A. et al., 2006. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5801), pp.997-1001.

- Pierce, A.T. et al., 2005. Beta interferon and gamma interferon synergize to block viral DNA and virion synthesis in herpes simplex virus-infected cells. *The Journal of general virology*, 86(Pt 9), pp.2421-32.
- Pipkin, M.E. & Lieberman, J., 2007. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Current opinion in immunology*, 19(3), pp.301-8.
- Planz, O et al., 2001. A naturally processed rat major histocompatibility complex class I-associated viral peptide as target structure of borna disease virus-specific CD8+ T cells. *The Journal of biological chemistry*, 276(17), pp.13689-94.
- Planz, O et al., 1999. Pathogenesis of borna disease virus: granulocyte fractions of psychiatric patients harbor infectious virus in the absence of antiviral antibodies. *Journal of virology*, 73(8), pp.6251-6.
- Planz, O & Stitz, L, 1999. Borna disease virus nucleoprotein (p40) is a major target for CD8(+)-T-cell-mediated immune response. *Journal of virology*, 73(2), pp.1715-8.
- Plata-Salamán, C.R. et al., 1999. Persistent Borna disease virus infection of neonatal rats causes brain regional changes of mRNAs for cytokines, cytokine receptor components and neuropeptides. *Brain research bulletin*, 49(6), pp.441-51.
- Pleschka, S. et al., 2001. Conservation of coding potential and terminal sequences in four different isolates of Borna disease virus. *The Journal of general virology*, 82(Pt 11), pp.2681-90.
- Pletnikov, M V et al., 2001. Neonatal Borna disease virus infection (BDV)-induced damage to the cerebellum is associated with sensorimotor deficits in developing Lewis rats. *Brain research. Developmental brain research*, 126(1), pp.1-12.
- Pletnikov, M V et al., 2000. Effects of neonatal rat Borna disease virus (BDV) infection on the postnatal development of the brain monoaminergic systems. *Brain research. Developmental brain research*, 119(2), pp.179-85.
- Pletnikov, M V et al., 1999. Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism. *Behavioural brain research*, 100(1-2), pp.43-50.
- Pletnikov, M. & Gonzalez–Dunia, D., 2002. Experimental infection: pathogenesis of neurobehavioral disease. In *Borna Disease Virus and its role in neurobehavioral disease*. pp. 125-178.
- Pletnikov, Mikhail V, Moran, Timothy H & Carbone, Kathryn M, 2002. Borna disease virus infection of the neonatal rat: developmental brain injury model of autism

- spectrum disorders. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 7, pp.d593-607.
- Pletnikov, Mikhail V et al., 2002. Effects of genetic background on neonatal Borna disease virus infection-induced neurodevelopmental damage. I. Brain pathology and behavioral deficits. *Brain research*, 944(1-2), pp.97-107.
- Poenisch, M. et al., 2009. Protein X of Borna disease virus inhibits apoptosis and promotes viral persistence in the central nervous systems of newborn-infected rats. *Journal of virology*, 83(9), pp.4297-307.
- Pope, J.G. et al., 1998. Characterization of and functional antigen presentation by central nervous system mononuclear cells from mice infected with Theiler's murine encephalomyelitis virus. *Journal of virology*, 72(10), pp.7762-71.
- Poyet, J. et al. Identification of Ipaf, a human caspase-1 activating protein related to Apaf-1. *The journal of bio.chem.*, 30(276), pp. 28309-13.
- Prat, C.M. a et al., 2009. Mutation of the protein kinase C site in borna disease virus phosphoprotein abrogates viral interference with neuronal signaling and restores normal synaptic activity. *PLoS pathogens*, 5(5), p.e1000425.
- Préhaud, C. et al., 2005. Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon. *Journal of virology*, 79(20), pp.12893-904.
- Puorger, M.E. et al., 2010. Distribution of Borna disease virus antigen and RNA in tissues of naturally infected bicolored white-toothed shrews, *Crocidura leucodon*, supporting their role as reservoir host species. *Veterinary pathology*, 47(2), pp.236-44.
- Purbhoo, M.A. et al., 2004. T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nature immunology*, 5(5), pp.524-30.
- Qin, H. et al., 2008. Expression and functional significance of SOCS-1 and SOCS-3 in astrocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(5), pp.3167-76.
- Qin, H. et al., 2006. IFN-beta-induced SOCS-1 negatively regulates CD40 gene expression in macrophages and microglia. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(7), pp.985-7.
- Racaniello, V.R., 2001. *Picornaviridae: The viruses and their replication*. In *Fields Virology* Philadelph., .R., D. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, and S.E. Straus.

- Racaniello, Vincent R, 2006. One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology*, 344(1), pp.9-16.
- Rall, G F, Mucke, L. & Oldstone, M.B., 1995. Consequences of cytotoxic T lymphocyte interaction with major histocompatibility complex class I-expressing neurons in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 182(5), pp.1201-12.
- Ramakrishna, C. et al., 2006. Vaccine-induced memory CD8+ T cells cannot prevent central nervous system virus reactivation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(5), pp.3062-9.
- Ransohoff, R M, Kivisakk, P. & Kidd, G, 2003. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol*, 3, pp.569-581.
- Ransohoff, Richard M & Cardona, A.E., 2010. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*, 468(7321), pp.253-62.
- Rassa, J.C. et al., 2002. Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), pp.2281-6.
- Rassa, J.C. & Ross, S.R., 2003. Viruses and Toll-like receptors. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 5(11), pp.961-8.
- Reese, T.S. & Karnovsky, M.J., 1967. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *The Journal of cell biology*, 34(1), pp.207-17.
- Reeves, N.A. et al., 1998. Natural Borna disease virus infection in cats in the United Kingdom. *The Veterinary record*, 143(19), pp.523-6.
- Reichmann, G. et al., 2002. Dendritic cells and dendritic-like microglia in focal cortical ischemia of the mouse brain. *Journal of neuroimmunology*, 129(1-2), pp.125-32.
- Reis e Sousa, C., 2004. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Seminars in immunology*, 16(1), pp.27-34.
- Rensing-Ehl, A. et al., 1996. Neurons induced to express major histocompatibility complex class I antigen are killed via the perforin and not the Fas (APO-1/CD95) pathway. *European journal of immunology*, 26(9), pp.2271-4.
- Richart, S.M. et al., 2003. Entry of herpes simplex virus type 1 into primary sensory neurons in vitro is mediated by Nectin-1/HveC. *Journal of virology*, 77(5), pp.3307-11.
- Richt, J A et al., 1997. Borna disease virus infection in animals and humans. *Emerging infectious diseases*, 3(3), pp.343-52.

- Richt, J A & Rott, R., 2001. Borna disease virus: a mystery as an emerging zoonotic pathogen. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 161(1), pp.24-40.
- Richt, J A et al., 1992. Infection with Borna disease virus: molecular and immunobiological characterization of the agent. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 14(6), pp.1240-50.
- Richter, K. et al., 2007. Pathogenic potential of borna disease virus lacking the immunodominant CD8 T-cell epitope. *Journal of virology*, 81(20), pp.11187-94.
- Rivera-Quiñones, C. et al., 1998. Absence of neurological deficits following extensive demyelination in a class I-deficient murine model of multiple sclerosis. *Nature medicine*, 4(2), pp.187-93.
- Robbins, P.A. & McMichael, A.J., 1991. Immune recognition of HLA molecules downmodulates CD8 expression on cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, 173(1), pp.221-30.
- Robertson, B. et al., 2000. Interferon-gamma-responsive neuronal sites in the normal rat brain: receptor protein distribution and cell activation revealed by Fos induction. *Brain research bulletin*, 52(1), pp.61-74.
- Roth-Cross, J.K., Bender, S.J. & Weiss, S.R., 2008. Murine coronavirus mouse hepatitis virus is recognized by MDA5 and induces type I interferon in brain macrophages/microglia. *Journal of virology*, 82(20), pp.9829-38.
- Rott, R. & Becht, H., 1995. Natural and experimental Borna disease in animals. *Current topics in microbiology and immunology*, 190, pp.17-30.
- Rott, R. et al., 1985. Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. *Science (New York, N.Y.)*, 228(4700), pp.755-6.
- Rottenberg, M. & Kristensson, Krister, 2002. Effects of interferon-gamma on neuronal infections. *Viral immunology*, 15(2), pp.247-60.
- Rubin, S A et al., 1999. Viral teratogenesis: brain developmental damage associated with maturation state at time of infection. *Brain research. Developmental brain research*, 112(2), pp.237-44.
- Rubin, S A et al., 1999. Borna disease virus-induced hippocampal dentate gyrus damage is associated with spatial learning and memory deficits. *Brain research bulletin*, 48(1), pp.23-30.
- Ruckenstein, M.J. et al., 1999. Effects of immunosuppression on the development of cochlear disease in the MRL-Fas(lpr) mouse. *The Laryngoscope*, 109(4), pp.626-30.

- Ruijs, T.C. et al., 1990. Human oligodendrocytes are susceptible to cytolysis by major histocompatibility complex class I-restricted lymphocytes. *Journal of neuroimmunology*, 27, pp 89-97.
- Russell, John H & Ley, T.J., 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology*, 20, pp.323-70.
- Sainz, B. et al., 2005. Synergistic inhibition of human cytomegalovirus replication by interferon-alpha/beta and interferon-gamma. *Virology journal*, 2, p.14.
- Saito, T. et al., 2007. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(2), pp.582-7.
- Sakić, B. et al., 1998. Progressive atrophy of pyramidal neuron dendrites in autoimmune MRL-lpr mice. *Journal of neuroimmunology*, 87(1-2), pp.162-70.
- Salinas, S., Schiavo, G. & Kremer, E.J., 2010. A hitchhiker's guide to the nervous system: the complex journey of viruses and toxins. *Nature reviews. Microbiology*, 8(9), pp.645-55.
- Sallusto, F. et al., 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *European Journal of Immunology*, 28(9), pp.2760-2769.
- Samuel, M.A. & Diamond, M.S., 2006. Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *Journal of virology*, 80(19), pp.9349-60.
- Sanchez-Ruiz, M. et al., 2008. Molecular mimicry between neurons and an intracerebral pathogen induces a CD8 T cell-mediated autoimmune disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(12), pp.8421-33.
- Sandberg, K., Eloranta, M.L. & Campbell, I L, 1994. Expression of alpha/beta interferons (IFN-alpha/beta) and their relationship to IFN-alpha/beta-induced genes in lymphocytic choriomeningitis. *Journal of virology*, 68(11), pp.7358-66.
- Sato, A., Linehan, M.M. & Iwasaki, A., 2006. Dual recognition of herpes simplex viruses by TLR2 and TLR9 in dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46), pp.17343-8.
- Sauder, C & de la Torre, J C, 1999. Cytokine expression in the rat central nervous system following perinatal Borna disease virus infection. *Journal of neuroimmunology*, 96(1), pp.29-45.

- Sauder, C et al., 2001. Learning deficits in mice with persistent Borna disease virus infection of the CNS associated with elevated chemokine expression. *Behavioural brain research*, 120(2), pp.189-201.
- Sauder, Christian & Staeheli, Peter, 2003. Rat model of borna disease virus transmission: epidemiological implications. *Journal of virology*, 77(23), pp.12886-90.
- Savarin, C. & Bergmann, Cornelia C, 2008. Neuroimmunology of central nervous system viral infections: the cells, molecules and mechanisms involved. *Current opinion in pharmacology*, 8(4), pp.472-9.
- Saxena, A. et al., 2008. Cutting Edge: Multiple Sclerosis-Like Lesions Induced by Effector CD8 T Cells Recognizing a Sequestered Antigen on Oligodendrocytes. *The Journal of Immunology*, pp.1-5.
- Schamel, K., Staeheli, P & Hausmann, J, 2001. Identification of the immunodominant H-2K(k)-restricted cytotoxic T-cell epitope in the Borna disease virus nucleoprotein. *Journal of virology*, 75(18), pp.8579-88.
- Schmid, S. et al., 2007. Functional characterization of the major and minor phosphorylation sites of the P protein of Borna disease virus. *Journal of virology*, 81(11), pp.5497-507.
- Schneemann, A., Schneider, P.A. & Lipkin, W.I., 1995. The atypical strategies used for gene expression of Borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *Virus*, 45(2), pp.165-74.
- Schneider, U. et al., 2004. Overlap of interaction domains indicates a central role of the P protein in assembly and regulation of the Borna disease virus polymerase complex. *The Journal of biological chemistry*, 279(53), pp.55290-6.
- Schroder, K. & Tschopp, J., 2010. The inflammasomes. *Cell*, 140(6), pp.821-32.
- Schulz, O. et al., 2010. Protein Kinase R contributes to immunity against specific viruses by regulating interferon mRNA integrity. *Cell Host & Microbe*, 5(7), pp.354-361.
- Schwemmler, M et al., 1997. Borna disease virus P-protein is phosphorylated by protein kinase Cepsilon and casein kinase II. *The Journal of biological chemistry*, 272(35), pp.21818-23.
- Seder, R.A. & Ahmed, R., 2003. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nature immunology*, 4(9), pp.835-42.
- Sedgwick, J.D. et al., 1991. Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, 88(16), pp.7438-42.

Serafini, B et al., 2000. Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The American journal of pathology*, 157(6), pp.1991-2002.

Serafini, Barbara et al., 2007. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *The Journal of experimental medicine*, 204(12), pp.2899-912.

Shao, W. et al., 2007. The caspase-1 digestome identifies the glycolysis pathway as a target during infection and septic shock. *The journal of bio. chem.*, 50 (282), pp.36321-9.

Sharpe, A.H. et al., 2007. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature immunology*, 8(3), pp.239-45.

Sherer, N.M. et al., 2007. Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. *Nature cell biology*, 9(3), pp.310-5.

Shirai, Y., 1921. On the transplantation of the rat sarcoma in adult heterogenous animals. *Jap. Med. World*, 1, pp.14-15.

Shrestha, B. et al., 2006. Gamma interferon plays a crucial early antiviral role in protection against West Nile virus infection. *Journal of virology*, 80(11), pp.5338-48.

Smith, G.A. et al., 2004. Local modulation of plus-end transport targets herpesvirus entry and egress in sensory axons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(45), pp.16034-9.

Sobbe, M. et al., 1997. Induction of degenerative brain lesions after adoptive transfer of brain lymphocytes from Borna disease virus-infected rats: presence of CD8+ T cells and perforin mRNA. *Journal of virology*, 71(3), pp.2400-7.

Sodeik, B, Ebersold, M.W. & Helenius, A., 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *The Journal of cell biology*, 136(5), pp.1007-21.

Solbrig, M.V., Fallon, J.H. & Lipkin, W.I., 1995. Behavioral disturbances and pharmacology of Borna disease. *Current topics in microbiology and immunology*, 190, pp.93-101.

Solbrig, M.V. et al., 1994. Tardive dyskinesic syndrome in rats infected with Borna disease virus. *Neurobiology of disease*, 1(3), pp.111-9.

- Solbrig, M.V. et al., 1996. Prefrontal cortex dysfunction in Borna disease virus (BDV)--infected rats. *Biological psychiatry*, 40(7), pp.629-36.
- Solbrig, M.V. et al., 1996. A neural substrate of hyperactivity in borna disease: changes in brain dopamine receptors. *Virology*, 222(2), pp.332-8.
- Song, H.-jun, Stevens, C.F. & Gage, F.H., 2002. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nature neuroscience*, 5(5), pp.438-45.
- Sowinski, S. et al., 2008. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nature cell biology*, 10(2), pp.211-9.
- Spear, P.G. & Longnecker, R., 2003. Herpesvirus entry: an update. *Journal of virology*, 77(19), pp.10179-85.
- Stadelmann, C. et al., 2008. Cortical pathology in multiple sclerosis. *Current opinion in neurology*, 21(3), pp.229-34.
- Staheli, P et al., 2000. Epidemiology of Borna disease virus. *The Journal of general virology*, 81(Pt 9), pp.2123-35.
- Stahl, T. et al., 2003. Characterization of the acute immune response in the retina of Borna disease virus infected Lewis rats. *Journal of neuroimmunology*, 137(1-2), pp.67-78.
- Stetson, D.B. & Medzhitov, Ruslan, 2006. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity*, 24(1), pp.93-103.
- Stevenson, P.G. et al., 1997. The immunogenicity of intracerebral virus infection depends on anatomical site. *Journal of virology*, 71(1), pp.145-51.
- Stitz, L et al., 1998. A functional role for neutralizing antibodies in Borna disease: influence on virus tropism outside the central nervous system. *Journal of virology*, 72(11), pp.8884-92.
- Stitz, Lothar, Bilzer, Thomas & Planz, Oliver, 2002. The immunopathogenesis of Borna disease virus infection. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 7, pp.d541-55.
- Stohlman, S A et al., 1998. CTL effector function within the central nervous system requires CD4+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 160(6), pp.2896-904.

- Stohlman, S A et al., 1995. Mouse hepatitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes protect from lethal infection without eliminating virus from the central nervous system. *Journal of virology*, 69(2), pp.684-94.
- Stumhofer, J.S. et al., 2006. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nature immunology*, 7(9), pp.937-45.
- Sun, D. et al., 2001. Myelin antigen-specific CD8⁺ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J. Immunol*, 166, pp.7579-7587.
- Suvas, S., Azkur, A.K. & Rouse, B.T., 2006. Qa-1b and CD94-NKG2a interaction regulate cytolytic activity of herpes simplex virus-specific memory CD8⁺ T cells in the latently infected trigeminal ganglia. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(3), pp.1703-11.
- Sykulev, Y. et al., 1996. Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity*, 4(6), pp.565-71.
- Tabeta, K. et al., 2004. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), pp.3516-21.
- Takaoka, A. et al., 2007. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature*, 448(7152), pp.501-5.
- Takeuchi, O. & Akira, S., 2008. MDA5/RIG-I and virus recognition. *Current opinion in immunology*, 20(1), pp.17-22.
- Tedeschi, B., Barrett, J.N. & Keane, R.W., 1986. Astrocytes produce interferon that enhances the expression of H-2 antigens on a subpopulation of brain cells. *The Journal of cell biology*, 102(6), pp.2244-53.
- Tennakoon, D.K. et al., 2006. Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8⁺ T cells in multiple sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(11), pp.7119-29.
- Tomonaga, Keizo, Kobayashi, Takeshi & Ikuta, Kazuyoshi, 2002. Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 4(4), pp.491-500.
- Town, T. et al., 2005. T-cells in Alzheimer's disease. *Neuromolecular medicine*, 7(3), pp.255-64.
- Trajkovic, V. et al., 2004. Astrocyte-induced regulatory T cells mitigate CNS autoimmunity. *Glia*, 47(2), pp.168-79.

- Trapp, B.D. et al., 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*, 338(5), pp.278-85.
- Tschen, S.-I. et al., 2002. Recruitment kinetics and composition of antibody-secreting cells within the central nervous system following viral encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(6), pp.2922-9.
- Tucker, P.C. et al., 1996. Inhibition of nitric oxide synthesis increases mortality in Sindbis virus encephalitis. *Journal of virology*, 70(6), pp.3972-7.
- Tyor, W R et al., 1992. Long term intraparenchymal Ig secretion after acute viral encephalitis in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 149(12), pp.4016-20.
- Ubol, S. et al., 1995. Roles of immunoglobulin valency and the heavy-chain constant domain in antibody-mediated downregulation of Sindbis virus replication in persistently infected neurons. *Journal of virology*, 69(3), pp.1990-3.
- Ugolini, G., 2008. Use of rabies virus as a transneuronal tracer of neuronal connections: implications for the understanding of rabies pathogenesis. *Developments in biologicals*, 131, pp.493-506.
- Underhill, D.M. et al., 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*, 401(6755), pp.811-5.
- Unterstab, G. et al., 2005. Viral targeting of the interferon- β -inducing Traf family member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(38), pp.13640-5.
- Vahlenkamp, T W, Enbergs, H.K. & Müller, H, 2000. Experimental and natural borna disease virus infections: presence of viral RNA in cells of the peripheral blood. *Veterinary microbiology*, 76(3), pp.229-44.
- Vahlenkamp, Thomas W et al., 2002. Persistence of Borna disease virus in naturally infected sheep. *Journal of virology*, 76(19), pp.9735-43.
- van de Berg, P.J. et al., 2008. Cytotoxic human CD4(+) T cells. *Current opinion in immunology*, 20(3), pp.339-43.
- van Pesch, V., van Eyll, O. & Michiels, T, 2001. The leader protein of Theiler's virus inhibits immediate-early alpha/beta interferon production. *Journal of virology*, 75(17), pp.7811-7.

- Vass, K. & Lassmann, H, 1990. Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system. *The American journal of pathology*, 137(4), pp.789-800.
- Venkataraman, T. et al., 2007. Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(10), pp.6444-55.
- Versteeg, G. a & García-Sastre, A., 2010. Viral tricks to grid-lock the type I interferon system. *Current opinion in microbiology*, (Dc), pp.508-516.
- Vollstedt, S. et al., 2004. Interplay between alpha/beta and gamma interferons with B, T, and natural killer cells in the defense against herpes simplex virus type 1. *Journal of virology*, 78(8), pp.3846-50.
- Volmer, R., Monnet, C. & Gonzalez-Dunia, Daniel, 2006. Borna disease virus blocks potentiation of presynaptic activity through inhibition of protein kinase C signaling. *PLoS pathogens*, 2(3), p.e19.
- Volmer, R. et al., 2007. Borna disease virus infection impairs synaptic plasticity. *Journal of virology*, 81(16), pp.8833-7.
- Von Sind, J., 1781. Der im Feld und auf der Reise geschwind heilende Pferdearzt, welcher einen gründlichen Unterricht von den gewöhnlichsten Krankheiten der Pferde im Pfeld und auf der Reise wie auch einen auserlesenen Vorratha der nützlichsten und durch die Ehrfahrung bewährsten Heilungsmitteln eröffnet. 2nd und 3rd ed. Brönner Frankfurt.
- Wacher, C. et al., 2007. Coordinated regulation and widespread cellular expression of interferon-stimulated genes (ISG) ISG-49, ISG-54, and ISG-56 in the central nervous system after infection with distinct viruses. *Journal of virology*, 81(2), pp.860-71.
- Walker, M.P. et al., 2000. Expression and characterization of the Borna disease virus polymerase. *Journal of virology*, 74(9), pp.4425-8.
- Walsh, K.B., Lanier, L.L. & Lane, T.E., 2008. NKG2D receptor signaling enhances cytolytic activity by virus-specific CD8+ T cells: evidence for a protective role in virus-induced encephalitis. *Journal of virology*, 82(6), pp.3031-44.
- Walter, L. & Albert, M.L., 2007. Cutting edge: cross-presented intracranial antigen primes CD8+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(10), pp.6038-42.
- Wang, Q., Haluskey, J.A. & Lavi, E., 1998. Coronavirus MHV-A59 causes upregulation of interferon-beta RNA in primary glial cell cultures. *Advances in experimental medicine and biology*, 440, pp.451-4.

- Wang, W., Hu, D. & Xiong, H., 2008. Macrophage attenuation of neuronal excitability: implications for pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Glia*, 56(2), pp.241-6.
- Ward, L. a & Massa, P.T., 1995. Neuron-specific regulation of major histocompatibility complex class I, interferon-beta, and anti-viral state genes. *Journal of neuroimmunology*, 58(2), pp.145-55.
- Waterhouse, N.J. et al., 2006. Cytotoxic T lymphocyte-induced killing in the absence of granzymes A and B is unique and distinct from both apoptosis and perforin-dependent lysis. *The Journal of cell biology*, 173(1), pp.133-44.
- Watkins, S.C. & Salter, R.D., 2005. Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubules. *Immunity*, 23(3), pp.309-18.
- Weissenböck, H. et al., 2000. Microglial activation and neuronal apoptosis in Bornavirus infected neonatal Lewis rats. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 10(2), pp.260-72.
- Weissenböck, H. et al., 1998. Borna disease in a dog with lethal meningoencephalitis. *Journal of clinical microbiology*, 36(7), pp.2127-30.
- Wekerle, H & Fierz, W., 1985. T cell approach to demyelinating diseases. *Springer seminars in immunopathology*, 8(1-2), pp.97-110.
- Weller, R.O., Kida, S. & Zhang, E.T., 1992. Pathways of fluid drainage from the brain--morphological aspects and immunological significance in rat and man. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 2(4), pp.277-84.
- Wojtasiak, M. et al., 2004. Persistent expression of CD94/NKG2 receptors by virus-specific CD8 T cells is initiated by TCR-mediated signals. *International immunology*, 16(9), pp.1333-41.
- Wolff, T. et al., 2002. Characterization of an unusual importin alpha binding motif in the borna disease virus p10 protein that directs nuclear import. *The Journal of biological chemistry*, 277(14), pp.12151-7.
- Wyss-Coray, T et al., 1997. Astroglial overproduction of TGF-beta 1 enhances inflammatory central nervous system disease in transgenic mice . *Journal of neuroimmunology*, 77(1), pp.45-50.
- Xystrakis, E. et al., 2004. Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood*, 104(10), pp.3294-301.
- Yamada, S. et al., 1991. Albumin outflow into deep cervical lymph from different regions of rabbit brain. *The American journal of physiology*, 261(4 Pt 2), pp.H1197-204.

- Yamaguchi, K. et al., 1991. Protection of mice from a lethal coronavirus infection in the central nervous system by adoptive transfer of virus-specific T cell clones. *Journal of neuroimmunology*, 32(1), pp.1-9.
- Yasuda, K. et al., 2005. Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(10), pp.6129-36.
- Yoshida, H. et al., 2007. Retinoic acid-inducible gene-I mediates RANTES/CCL5 expression in U373MG human astrocytoma cells stimulated with double-stranded RNA. *Neuroscience research*, 58(2), pp.199-206.
- Zhu, Bing et al., 2003. Dendritic and synaptic pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis. *The American journal of pathology*, 162(5), pp.1639-50.
- Zinkernagel, R M et al., 1999. General and specific immunosuppression caused by antiviral T-cell responses. *Immunological reviews*, 168, pp.305-15.
- Zwick, W., 1939. Bornasche Krankheit und Encephalomyelitis der Tiere. In *Handbuch der Viruskrankheiten*. , pp.254-354.
- Zwick, W; Seifried, O., 1925. Übertragbarkeit der seuchenhaften Gehirnrückenmarksentzündung des Pferdes (Bornasche Krankheit) auf kleine Versuchstiere (Kaninchen). *Tierärztl. Wochenschr.*, (41), pp.129-132.

ANNEXE

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

Neurons behave as MHC class I-dependent targets for CD8 T cells upon neurotropic viral infection

Grégoire Chevalier^{1,2,3}, Elsa Suberbielle^{1,2,3,&}, Valérie Duplan^{1,2,3}, Celine Monnet^{1,2,3\$}, Guillaume Martin-Blondel^{1,2,3}, Fanny Farrugia⁴, Gwendal Le Masson⁴, Roland Liblau^{1,2,3} and Daniel Gonzalez-Dunia^{1,2,3*}

¹Inserm, U1043, Toulouse, France; ²CNRS, U5282, Toulouse, France; ³Université de Toulouse, UPS, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), Toulouse; ⁴INSERM, U862 and Université Bordeaux 2, Bordeaux, France.

* To whom correspondence should be addressed. Email: daniel.dunia@inserm.fr

&Present Address: Gladstone Institute of Neurological Diseases, San Francisco, CA 94158, USA.

\$Present Address: Millegen SA, Toulouse, France.

18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

Abstract

Following infection of the central nervous system (CNS), non-cytolytic strategies of virus elimination are often developed by the host to avoid excessive damage to neurons, which have limited capacity of regeneration. In particular, it was thought that neurons were protected from cytotoxic T lymphocytes (CTL) attack because they lack detectable expression of major histocompatibility class I (MHC I) molecules, at least at steady-state. Our goal was to get further insight about the modalities of the interaction between infected neurons and antiviral CD8 T cells in the course of a natural disease. We used the model of neuroinflammation caused by neurotropic Borna disease virus (BDV), in which CTL have been proposed as the main immune effectors triggering disease. We tested the pathogenic properties of brain-isolated CD8 T cells against pure neuronal cultures infected with BDV. We observed that BDV infection of cortical neurons triggered a significant up regulation of MHC I molecules, rendering them susceptible to recognition by antiviral CTL, freshly isolated from the brains of acutely infected rats. Using real-time imaging, we analyzed the spatio-temporal relationships between neurons and CTL. Brain-isolated CTL exhibited a reduced mobility and established stable contacts with BDV-infected neurons, in an antigen- and MHC-dependent manner. This interaction induced rapid morphological changes of the neurons, without immediate killing or impairment of neuronal activity, since early signs of neuronal apoptosis were detected only hours after this initial contact. Thus, our results reveal that infected neurons can be recognized efficiently by antiviral CD8 T cells and uncover the unusual modalities of CTL-induced neuronal damage.

43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66

Author summary

When a virus infects the brain, it is important to quickly block viral replication without causing excessive damage to neurons, which are not easily renewed. Cytotoxic T lymphocytes (CTL) are one of the main actors for virus elimination, resulting from their specific recognition and destruction of infected cells. However, the question of whether CTL are indeed capable of destroying infected neurons remains controversial. For this work, we analyzed the characteristics of interactions between infected neurons and CTL using neurotropic Borna disease virus (BDV). This virus infects neurons and triggers severe inflammation in the brain. We isolated CTL directly from the brains of rats undergoing this acute inflammatory disease and analyzed their interaction with primary cultures of neurons which had been infected with BDV. Using live-cell fluorescence microscopy, we observed that CTL movements were arrested in the culture upon encounter with infected neurons and that they established stable contacts with them. After this contact, infected neurons exhibited rapid changes in permeability but remained alive and electrically active for several hours, before ultimately being destroyed. Our study shows that neurons can indeed be recognized by CTL, an important observation for a better understanding of the physiopathology of virus-induced brain inflammation. In addition, it reveals that neurons are relatively resistant to CTL-induced killing, which may open a window of opportunity for new treatments.

66

67 **Introduction**

68

69 A better understanding of the interactions between viruses and the central nervous
70 system (CNS) represents a major issue in viral pathogenesis. Indeed, viral persistence
71 in the CNS represents a challenge both for the host and the pathogen. On the virus
72 side, it is essential to adapt a strategy of replication that will minimize virus-induced cell
73 damage and limit its recognition by the immune response. On the host side, it is
74 essential to quickly halt virus multiplication, while causing minimal damage to CNS
75 resident cells and in particular to neurons which have limited capacities of renewal [1,2].
76 These issues are complicated by the unique immunologic properties of the CNS,
77 originally referred to as an immune privileged site. It is now clear that this “privilege” is
78 very relative and that despite the blood-brain barrier and the absence of dedicated
79 lymphoid drainage [3], the immune response can generally control invasion of the CNS
80 by pathogens, although often at the expense of irremediable tissue damage due to
81 excessive inflammation.

82

83 Among the different immune effectors involved in viral elimination, CD8 T cells have
84 received much attention, owing to their essential roles in the primary protection of the
85 host against infectious diseases. CD8 cytotoxic T lymphocytes (CTL) mediate their
86 antiviral effects by recognizing viral peptides presented by class I major
87 histocompatibility complex (MHC I) molecules. Upon engagement of the T cell receptor
88 (TCR) with the peptide-loaded MHC I complex, CTL mediate cell killing essentially
89 through two independent pathways: perforin-dependent delivery of granzymes and
90 interaction of Fas-ligand (FasL) with the Fas-receptor on the target cell surface. These
91 lytic mechanisms could, however, have devastating consequences in the CNS and it
92 has been shown that alternative non-cytolytic mechanism can also be engaged by CTL
93 [4,5]. In particular, antiviral cytokines produced by CD8 T cells, such as interferon
94 gamma (IFN- γ) or tumor necrosis factor alpha (TNF- α), can stimulate intracellular
95 pathways that interfere with viral replication, resulting in complete or partial clearance
96 from the cell without destroying it. Furthermore, both mechanisms can be combined to
97 limit viral multiplication in the brain. One example is infection with Herpes simplex virus

98 type 1 (HSV-1), for which latency is controlled by IFN- γ produced by CD8 T and by
99 granzyme B-mediated degradation of the HSV-1 immediate early protein ICP4 [6,7].

100
101 As recognition of peptide-MHC I complexes is essential to elicit CTL effector functions, it
102 has long been considered that neurons were spared from CD8 T cell attack because
103 they did not express MHC I molecules [8,9]. Recent studies, however, have challenged
104 this view. First, accumulating evidence has revealed that MHC I expression in the
105 developing and adult CNS can have additional non-immune functions. Indeed, neuronal
106 MHC I molecules appears to be crucial for normal brain development, neuronal
107 differentiation and plasticity [10,11]. In addition to this role for MHC I in CNS function, it
108 was also shown that neurons could express MHC I molecules under inflammatory
109 conditions. For example, in Rasmussen's encephalitis, histopathological examination of
110 autopsy material revealed the presence of granzyme B-containing CD8 T cells in direct
111 apposition to MHC I positive neurons [12]. Further evidence of MHC I inducibility in
112 neurons was provided *in vitro*. Indeed, it has been shown that primary cultures of
113 neurons treated with IFN- γ and electrically silenced using tetrodotoxin (TTX) can be
114 induced to express MHC I molecules on their surface [13]. This expression is
115 functionally relevant, as CTL can attack peptide-pulsed neurons in an antigen-specific
116 manner *in vitro* [14]. One caveat of such studies, however, is that they were performed
117 using neurons loaded with non-limiting amounts of exogenous peptides. Moreover, CD8
118 T cells used in these assays were either CTL clones or lines with well-defined epitope
119 specificity, often derived for practical reasons from TCR-transgenic animals. CTL were
120 also often further differentiated *in vitro* or restimulated for several rounds in culture.
121 Despite the above-mentioned limitations, several studies using variations of this
122 experimental paradigm have provided considerable insight on MHC I-restricted immune
123 interactions with neurons [2,15]. One major and still unresolved issue in neurovirology,
124 however, is whether antiviral CD8 T cells can indeed recognize and directly attack virus-
125 infected neurons in the course of a natural disease.

126
127 Infection with Borna disease virus (BDV) appears as a very suitable model system to
128 address these questions. BDV is an enveloped virus which belongs to the order of
129 *Mononegavirales*, with a non-segmented, negative strand RNA genome [16,17]. The

130 BDV compact genome encodes for only six proteins: the nucleoprotein (N),
131 phosphoprotein (P), protein X, matrix protein (M), the glycoprotein (G) and the
132 polymerase (L). BDV infects the CNS of a wide variety of mammals [18,19] and induces
133 a large spectrum of neurological disorders, ranging from immune-mediated diseases to
134 behavioral alterations without inflammation [18,20,21]. Despite this wide host range,
135 there is still controversy regarding whether BDV can infect humans and is associated
136 with neurological diseases [22,23,24]. Intriguingly, endogenous Borna-like N (EBLN)
137 elements were recently identified in the genome of several mammalian species,
138 including humans [25,26]. Although these findings suggest that BDV successfully
139 infected humans in the past, it is unclear whether this might still be the case with the
140 current BDV strains circulating in nature.

141
142 BDV is characterized by a remarkable non-cytolytic strategy of replication, both *in vivo*
143 and *in vitro*. Consequently, most of the virus-induced pathology results either from viral
144 interference with neuronal function or from the consequences of the antiviral immune
145 response. One of the best-investigated animal models for the pathogenesis of BDV
146 infection is the Lewis rat. After intracerebral infection, the animals develop an acute
147 meningo-encephalitis in which the infiltrating immune cells are mainly comprised of CD8
148 T cells, together with less numerous CD4⁺ T cells and macrophages [27,28]. Several
149 studies showing the preferential presence of CD8 T cells in direct proximity to neuronal
150 cell lesions and adoptive transfer experiments have clearly established the central role
151 of CD8 T cells in Borna disease [29,30,31].

152
153 In this study, our goal was to provide further insight on the specifics on neuron / CD8 T
154 cell interactions in the course of a natural disease and to determine the ensuing
155 functional consequences. We used BDV-infected primary cultures of neurons from
156 Lewis rats. These neurons were incubated, without any further manipulation, with CD8 T
157 cells directly extracted from the brains of BDV-infected Lewis rats. We found that the
158 infected neurons were recognized and lysed, thus demonstrating that they were able to
159 process and present MHC I-restricted viral epitopes to CD8 T cells. We also further
160 analyzed the outcome of the cognate interactions between CD8 T cells and BDV-
161 infected neurons.

162

163 **Results**

164

165 **BDV infection triggers neuronal MHC I expression.** We used cortical neurons
166 prepared from Lewis rat embryos that had been infected with cell-free BDV one day
167 after plating and further cultured for 14 days. At this time point, neurons have
168 established mature synapses [32] and the virus has spread to all of them, in agreement
169 with our previous findings [33,34,35]. Detection of the BDV nucleoprotein using
170 immunofluorescence analysis (Fig. 1A and B) confirmed that the large majority (>98%)
171 of neurons was positive for BDV antigens and that infection proceeded without
172 detectable effect on the morphology or viability of the cultures, consistent with the non-
173 cytolytic replication strategy of BDV.

174 We then assessed expression of MHC I molecules on the neuronal surface, since this is
175 a key prerequisite for antigen presentation to CD8 T lymphocytes. We used infected and
176 non-infected neurons, as well as non-infected neurons that had been treated for 72 h
177 with IFN- γ (100 U/ml) and TTX (1 μ M), to induce MHC I expression [13]. We also used
178 non-infected neurons treated for 72 h with IFN- β (100 U/ml). Living neurons still
179 attached to the plastic were stained using a monoclonal antibody recognizing the Lewis
180 MHC I RT1-A molecule. After staining, neurons were rapidly harvested, fixed and further
181 stained for the intracellular neuronal protein Tau. Flow cytometry analysis (Fig. 1C and
182 D) revealed that cultures contained > 98 % neurons and that non-infected neurons
183 expressed little or no MHC molecules (0.5 ± 0.3 % positive neurons). As previously
184 published [13], treatment with IFN- γ and TTX strongly induced MHC I expression (70 ± 5
185 % positive neurons). Interestingly, BDV infection triggered a significant expression of
186 neuronal MHC I (30 ± 3.5 % positive neurons). Analysis of mean fluorescence
187 intensities (MFI, Fig. 1E) revealed that levels of surface expression of MHC I induced by
188 BDV infection were nevertheless 2-3 fold lower than those obtained by neuronal
189 exposure to IFN- γ and TTX. Of note, treatment of non-infected neurons with IFN- β
190 induced comparable proportion (30 ± 3 %) and levels of MHC I expression (Fig. 1E)
191 than infection with BDV.

192 Thus, BDV infects neuronal cultures efficiently and triggers significant neuronal MHC I
193 expression. For all subsequent studies, we used neurons that had been infected for the

194 same length of time (14 days) and verified for each experiment that infection was indeed
195 complete prior to any subsequent analysis.

196

197 **CD8 T cells preferentially infiltrate the CNS upon BDV infection and express**
198 **cytotoxic effectors.** Lewis rats were sacrificed 14 days after intracerebral infection with
199 BDV. In previous experiments, we determined that this time point corresponded to the
200 peak of the neurological disease caused by BDV infection and that inflammatory
201 infiltrates were most abundant in the brain at this stage [36]. Consistent with previous
202 reports, phenotypic characterization of brain-infiltrating lymphocytes using flow
203 cytometry revealed that CD8 T cells accounted for 51 % \pm 1.5 % of all T cells present in
204 the brain (i.e., positive for the TCR), whereas CD4⁺ T cells represented 30 % \pm 3 % of
205 TCR⁺ cells (Fig. 2A). This 1.7 to 1 ratio of CD8 to CD4 cells in the brain contrasted with
206 the usual 1 to 3 ratio found in cervical lymph nodes of the same animals, reflecting the
207 high proportion of CD8 T cells recruited to the CNS upon BDV infection. Moreover, this
208 ratio is probably under-estimated since we detected a high proportion of TCR⁺ cells that
209 were negative for both CD4 and CD8 expression, presumably due to down-modulation
210 of CD8 expression upon activation [37]. To further analyze the phenotype of these cells,
211 we purified CD8 T cells using cell sorting (> 99 % pure), within a few hours after
212 harvesting. We prepared total RNA from sorted CD8 T cells and analyzed expression of
213 several genes by real-time quantitative RT-PCR. When compared to CD8 T cells
214 purified from lymph nodes of the same animals (Fig. 2B), brain-infiltrating lymphocytes
215 expressed high levels of effector molecules such as IFN- γ (300-fold induction on
216 average), Granzyme B (180-fold induction) or FasL (50-fold induction). Although
217 expression of Perforin mRNA was not significantly elevated when compared to lymph
218 node cells of the same infected animals, levels were 5 to 6 times higher than those
219 found in CD8 T cells purified from splenocytes of naïve rats (Fig S2).

220 To determine the proportion of brain-derived CD8 T cells specific for BDV, highly
221 purified CD8 T cells were stimulated with irradiated syngeneic antigen-presenting cells
222 and assayed for IFN- γ secretion. On average, 25 % \pm 3 % of CD8 T cells were positive
223 for IFN- γ following a 48 h-stimulation period with infected Lewis fibroblasts, whereas this
224 percentage was of 11 % \pm 2.5 % upon culture with non-infected cells (Fig. 2C).

225 Finally, we assessed whether brain- or lymph node-purified CD8 T cells secreted
226 cytokines upon incubation with primary cultures of neurons that were infected with BDV
227 or not. Cytokine levels in the supernatants were assayed at 48 h with a Luminex assay
228 specific for 9 rat cytokines. We did not detect any cytokine above the threshold level of
229 detection of the assay (4.88 pg/ml) in the supernatants of CD8 T cells purified from
230 lymph nodes. In contrast, brain-purified CD8 T cells produced high levels of IFN- γ
231 (around 9 ng/ml) upon culture with infected neurons. These cells also produced IL-10,
232 albeit at levels well below those of IFN- γ . Remarkably, levels were also much lower
233 when brain-purified CD8 T cells were incubated with non-infected neurons, suggesting
234 that cytokine secretion resulted mainly from the presentation of viral antigens by
235 neurons (Fig. 2D). Finally, there were no differences regarding levels of IL-6, IL-17 or
236 TNF- α , while results were below threshold for IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13 (Fig. S3).
237 Together, these data show that BDV infection triggers a prominent recruitment of CD8 T
238 cells in the brain. These cells are strongly activated, express high levels of effector
239 molecules and produce the proinflammatory cytokine IFN- γ upon interaction with BDV-
240 infected neurons.

241
242 **Brain-purified CD8 T cells are arrested upon contact with infected neurons, which**
243 **they recognise in an antigen- and MHC I-dependent manner.** To get further insight
244 on the dynamics of interactions between CD8 T cells and neurons, we stained purified
245 CD8 T cells (both from brain or lymph nodes) with the lipophilic dye PKH-26. After
246 washes, CD8 T cells were added to neuronal cultures previously labeled with Calcein-
247 AM and we performed confocal microscopy imaging using a temperature controlled
248 imaging setup (Fig. 3, videos S1 and S2). Imaris software was used for image analysis
249 and automated tracking of CD8 T cells. The accuracy of the automated tracking was
250 manually controlled, and only tracks with durations of >120 s were included in the
251 analysis. Strikingly, the mobility of CD8 T cells isolated from the brain was extremely
252 reduced upon incubation with BDV-infected neurons compared to non-infected ones.
253 Indeed, the measured mean velocity was 2.81 $\mu\text{m}/\text{min}$ (95 % confidence interval (CI) of
254 mean 2.59 - 3.03) in the presence of infected neurons compared to 15.27 $\mu\text{m}/\text{min}$, (95
255 % CI 13.00 - 17.53) with non-infected ones. Furthermore, once arrested, CD8 T cells
256 established stable interactions with BDV-infected neurons throughout the whole imaging

257 period (up to 45 min). In contrast, the same brain CD8 T cells exhibited a much more
258 dynamic behavior upon incubation with non-infected neurons. Induction of MHC I
259 expression at the surface of neurons with IFN- γ and TTX was not sufficient to arrest
260 CD8 T cells (mean velocity 14.84 $\mu\text{m}/\text{min}$, 95 % CI 11.60 - 18.07). Conversely, masking
261 MHC I molecules on BDV-infected neurons using OX-18 antibody restored a high
262 mobility of CD8 T cells (16.62 $\mu\text{m}/\text{min}$, 95 % CI 14.24 – 19.00). In addition, relative
263 frequencies of CD8 T cell moving at various velocities were similar when comparing
264 non-infected neurons, non-infected neurons treated with IFN- γ and TTX or BDV-infected
265 neurons treated with anti-MHC I antibody (Fig. 3D). Finally, CD8 T cells purified from
266 cervical lymph nodes of the same infected animals were highly mobile, regardless of
267 whether they were assayed on infected or non-infected neurons (video S7). Collectively,
268 these data show that CD8 T cells freshly purified from BDV-infected rat brains establish
269 stable conjugates with infected neurons and that this interaction depends upon both
270 neuronal infection and MHC I expression.

271
272 **Brain purified CD8 T cells induce early changes in neuronal permeability,**
273 **associated with increased neuronal electrical activity.** We then sought to analyze
274 the impact of this stable interaction with CD8 T cells on BDV-infected neurons. When
275 calcein-loaded infected neurons were incubated with brain-purified CD8 T cells, we
276 observed a rapid leakage of the calcein dye, which is normally retained in cells with an
277 intact plasma membrane. We also observed the formation of “axonal beading” figures in
278 BDV-infected neurons, revealed by the formation of calcein dots lining the neurites,
279 while there were no visible changes in the neuronal network of control non-infected
280 neurons incubated with brain CD8 T cells (compare Fig. 4A with 4B and video S3 with
281 video S4 and S5). Axonal beading was observed throughout the culture upon incubation
282 with CD8 T cells, without any noticeable proximity with the sites of CD8 T cell interaction
283 with neurons (video S4). In order to quantify this phenomenon, neurons were imaged for
284 45 minutes after addition of brain CD8 T cells and levels of calcein measured at the end
285 of the experiment were subtracted from the image obtained at the beginning of the
286 incubation. The resulting differences in fluorescent signals therefore provided a good
287 estimate of calcein leakage (Fig. 4C). While there were only minimal changes when
288 brain CD8 T cells were applied to non-infected neurons, we detected a significant

289 increase of fluorescence when using BDV-infected neurons. Here again, incubation of
290 BDV-infected neurons with anti-MHC I antibody markedly decreased axonal beading
291 (Fig. 4C).

292 Given the changes in neuronal morphology consecutive to incubation with brain CD8 T
293 cells, we next studied its impact on the electrophysiological properties of neuronal
294 networks. We used a system based on microelectrode arrays (MEA), which allows to
295 monitor the firing pattern of a neuronal network grown on a grid of sixty electrodes
296 embedded in a culture dish (Fig. 5A) [38]. We assessed the impact of incubation with
297 CD8 T cells by measuring the frequency of grouped action potentials, or bursts, over the
298 neuronal network (Fig. 5B). Before adding CD8 T cells, spontaneous firing frequencies
299 were similar whether neurons were infected or not with BDV (0.037 ± 0.0008 Hz vs.
300 0.038 ± 0.0011 Hz), in agreement with our previous studies [33,35]. Upon addition of
301 brain-purified CD8 T cells (at a ratio of 1 to 1), the electrophysiological properties of non-
302 infected neurons remained remarkably stable throughout the whole experiment ($0.038 \pm$
303 0.0038 Hz after 6 h of incubation). In sharp contrast, the addition of CD8 T cells to BDV-
304 infected neurons triggered a significant increase of the mean burst frequency, which
305 doubled to attain 0.074 ± 0.0038 Hz. Remarkably, the neuronal network remained
306 electrically active up to 3 h after addition of CD8 T cells. Thereafter, we witnessed a
307 decline of the firing pattern, with neurons becoming nearly completely silent by 6 h of
308 incubation (Fig. 5B).

309
310 **Longer incubation times with brain-purified T cells lead to neuronal apoptosis.** To
311 explore the basis for this electrical silencing occurring after longer incubation times with
312 CD8 T cells, we analyzed whether interaction with CD8 T cells eventually triggered
313 neuronal apoptosis. The fluorescent probe FLICA, which involves covalent binding of
314 fluorescent Z-VAD to activated caspases, was used to detect activation of caspases 3
315 and 7 in live neurons. The intensity of fluorescent signals therefore provided a direct
316 quantification of apoptosis (Fig. 5C). Consistent with the maintenance of their electrical
317 activity, we did not detect significant apoptosis in non-infected neurons, even 4 h after
318 addition of brain CD8 T cells. BDV-infected neurons were also unaffected up to 2 h after
319 incubation with CD8 T cells, but after 4 h we detected a strong increase in fluorescence,
320 indicating prominent neuronal apoptosis. This observation was consistent with the loss

321 of electrical activity (Fig. 5B), and the progressive disaggregation of the neuronal
322 network observed by microscopy between 6 and 8 hours after incubation with CD8 T
323 cells (video S6). Pre-incubation of BDV-infected neurons with anti-MHC I antibody
324 significantly delayed neuronal apoptosis (Fig. 5C), further indicating that neuronal attack
325 by CD8 T cells is a process which depends on the recognition of MHC I/viral antigen
326 complexes at the surface of neurons.

327

328 **Discussion**

329

330 Besides their central role in the response to neurotropic viral infections, CD8 T cells are
331 increasingly being recognized as key players in the pathogenesis of many
332 neuroinflammatory diseases, including multiple sclerosis [39,40,41]. It is thought that
333 CTL act as effector cells and contribute to tissue damage, based on their preferential
334 accumulation in parenchymal infiltrates. The modalities of action of CD8 T cells in the
335 CNS and notably the interplay between immune regulation and pathogen control are,
336 however, complex and variable. Here, we provide novel information concerning the
337 modalities of interaction between antiviral CTL and infected neurons.

338

339 Our findings that BDV infection triggers MHC I expression by neurons were surprising
340 and somewhat unexpected. In general, viruses are better known for their capacity to
341 downregulate or prevent the expression of MHC I molecules on the cell surface, through
342 the expression of immunomodulatory viral proteins. Relevant examples of such proteins
343 include HIV Nef, KSHV MIR1 and MIR2, myxoma virus MV-Lap or several CMV proteins
344 [42,43,44]. These mechanisms of control should theoretically be even tighter in neurons,
345 which are less prone to express MHC I molecules. There may be several non-exclusive
346 mechanisms to explain our findings. First, as impairment of neuronal electrical activity
347 has been shown to induce MHC I expression, one hypothesis is that BDV infection may
348 trigger MHC I expression through its effects on neuronal activity. Indeed, we have
349 previously shown that BDV can impair synaptic plasticity [33,35] and these
350 electrophysiological alterations could play a role in MHC I induction. Alternatively, BDV
351 sensing by neurons could trigger the production of type-1 interferons, which in turn,
352 could induce MHC I expression. It is now well established that IFN- α/β can also induce

353 detectable levels of MHC I expression by neurons, although not as efficiently as IFN- γ
354 [1]. Recent evidence has clearly demonstrated that neurons can take part to the antiviral
355 defense by being both IFN- α/β producers and responders [45]. The fact that levels of
356 MHC I expression induced by BDV were similar to those obtained upon exogenous
357 application of IFN- β provides additional indirect evidence in support of this hypothesis.
358 Also consistent with these findings, microarray analyses provided experimental
359 evidence of a type-1 interferon signature in BDV-infected neurons (Table S1 and Fig
360 S1).

361
362 Even more surprising were our findings that neurons could not only express MHC I but
363 also act as antigen-presenting cells to CD8 T cells, triggering the secretion of several
364 cytokines such as IFN- γ and IL-10. Although the levels detected were lower than those
365 obtained after coculture with *bona fide* antigen-presenting cells (Fig S4), this uncovers a
366 novel aspect of neuro-immune interactions and reveals that neurons can process and
367 present antigenic peptides to CTL, an aspect which could not be assessed in
368 experimental systems using peptide-pulsed neurons. This is also consistent with
369 previous reports showing that neurons express different components of the molecular
370 machinery required for epitope processing and MHC I presentation, such as TAP1/TAP2
371 and LMP2/LMP7 [46,47]. Based on our cytokine secretion data and imaging studies,
372 antigen processing and MHC I presentation by neurons are clearly functionally relevant.
373 Indeed, CTL arrest and the ensuing changes in neuronal permeability and apoptosis
374 were all significantly prevented or delayed by the addition of an antibody masking MHC I
375 molecules.

376
377 Another interesting aspect concerned the modalities of attack of CTL against BDV-
378 infected neurons studied by real-time imaging. Within 45 minutes after CTL addition, we
379 observed changes in neuronal membrane permeability, revealed by leakage of the
380 fluorescent dye calcein. These were accompanied by morphological changes, variably
381 designated as axonal beading or blebbing by several authors, which appear to represent
382 a general response of neurons to various stressing insults. In particular, they have been
383 visualized in neurons following axonal transection and Wallerian degeneration [48],
384 oxidative stress [49], ischemia [50], trauma [51] or even allogeneic CTL [52]. Although

385 the underlying mechanism is not well understood, it seems to be accompanied by
386 mitochondrial dysfunction and delayed cell death. Recently, it was suggested that
387 calcein leakage from neurons following oxygen-glucose deprivation could result from
388 opening of neuronal hemichannels, a type of half-gap junctions that form large-
389 conductance channels and allow flux of ions and molecules [50]. It will be interesting to
390 test whether this is also the case following CD8 T cell engagement.

391
392 Remarkably, despite these early changes in neuronal permeability, the electrical
393 properties of infected neurons were preserved for a significant duration after addition of
394 brain-purified CTL. This contrasted with the immediate shutdown of electrical signaling,
395 both in single neurons and networks, which follows incubation of OVA peptide-pulsed
396 neurons with primed OT-I cells, as recently described by Meuth et al. [15]. Since
397 neurons were killed rapidly upon recognition by highly differentiated CD8 OT-I cells, our
398 observations suggest that neuronal survival upon CTL encounter may also be
399 dependent on the intensity of the “lethal hit” delivered by the CTL. Indeed, the different
400 kinetics of CTL engagement with neurons in our system is probably related to the fact
401 that CD8 T cells purified for the brains of BDV-infected rats were not subjected to further
402 *in vitro* stimulation and that the neurons were undergoing a natural viral infection, with
403 the density of MHC I / cognate peptides being closer to physiological levels. Recently, it
404 was shown that CNS-infiltrating CD8 T cells could recognize neurons infected with
405 Theiler’s virus [53], but the consequences of this interaction on neuronal physiology
406 were not assessed in this study.

407
408 At present, we can only speculate about the mechanisms of neuronal death triggered
409 by CTL. All cytolytic effectors, including IFN- γ , perforin, granzyme-B or FasL were
410 expressed by CD8 T cells purified from brains of BDV infected rats, albeit at lower levels
411 for perforin. Both Fas/FasL and perforin/granzyme pathways have been demonstrated
412 to be effective against neurons upon engagement with CTL [14,54,55]. Since cell death
413 appears to develop with slower kinetics when triggered through the Fas/FasL pathway
414 [56,57], given our observations that BDV-infected neurons are still electrically active
415 after three hours, we would favor the hypothesis that killing of BDV-infected neurons
416 preferentially occurs by this route. Alternatively, the relatively low density of MHC I

417 expression triggered by infection, together with a restricted expression of perforin could
418 lead to the formation of a relatively weak immunological synapse and a limited release
419 of cytolytic granules towards the infected neurons. Finally, protection against excessive
420 apoptosis may also be conferred by BDV infection *per se*. Recently, it was shown by
421 others that the BDV X protein could protect cells against Fas-mediated apoptosis *in vitro*
422 [58]. However, In our system, however, the kinetics or characteristics of CTL killing were
423 unchanged when we used neurons infected with the BDV-X(A6A7) mutant, which has
424 lost its capacity to block Fas-induced apoptosis *in vitro*, resulting from loss of the
425 mitochondrial localization of X (Fig S5).

426
427 Our findings have several important implications. First, we demonstrated the capacity of
428 neurons to process and present epitopes during the course of a natural infection,
429 leading to simulation of CD8 T cells and production of inflammatory cytokines.
430 Therefore, beyond being the mere targets of CD8-mediated cytotoxicity, neurons may
431 play an active part in the development of CNS inflammation through T cell activation and
432 cytokine release. Second, the slow kinetics of neuronal death suggests that this
433 progressive neuronal loss of function may leave open a window of opportunity for future
434 treatments. Very recently, it was shown that the immune-mediated axonal damage that
435 develops during autoimmune encephalomyelitis (in mice) or multiple sclerosis (in
436 humans) was a slow and likely reversible process [59]. These authors described this
437 process as “focal axonal degeneration”, beginning with axonal swelling and
438 mitochondrial dysfunction, very reminiscent of the axonal beading phenomenon
439 described herein. A better understanding of the mechanisms involved in our system may
440 provide novel putative targets that could then be tested in other systems triggering
441 axonal death, be they virally-mediated or not.

442

443

443

444 **Materials and Methods**

445

446 **Primary culture of neurons and viral infection.** Primary cortical neurons were
447 prepared from embryonic Lewis rats at gestational day 18 using a previously described
448 procedure [33,34] with the following modifications: after dissection, the cortex tissue was
449 dissociated by incubation for 15 min at 37 °C in phosphate buffer saline (PBS)
450 containing 10 U/ml Papain (Worthington), followed by gentle dissociation in PBS
451 containing 1.5 mg/ml BSA and 1.5 mg/ml Trypsin inhibitor (from chicken egg, Sigma).
452 Cultures were maintained in serum-free Neurobasal medium (Invitrogen) supplemented
453 with 0.5 mM glutamine, 1 % penicillin/streptomycin and 2 % B-27 supplement
454 (Invitrogen). Plating was performed on variable supports depending of the use (Lab-Tek
455 chambered coverglass, Nunc, culture dishes or glass coverslips), all previously coated
456 with poly-ornithine (Sigma) and Laminin (Roche). One day after plating, half of the
457 cultures were infected with cell-free BDV (Giessen strain He/80). Cell-released virus
458 stocks were prepared as described [60,61], using persistently infected Vero cells. By 14
459 days post-infection, BDV infection of neurons was verified by immunofluorescence for
460 each experiment using an anti-BDV nucleoprotein serum.

461

462 **Infection of rats.** Female Lewis rats (4-week-old) were obtained from Janvier SAS (Le
463 Genest St Isle, France) and maintained in our animal facility. All procedures were in
464 accordance with EU regulations on animal experimentation and received approval from
465 the local ethical committee. The day of infection, rats were anesthetized with a mixture
466 of ketamine (50 mg/kg of body weight) and xylazine (15 mg/kg of body weight). They
467 were inoculated intracranially with 50 µL of a 20 % (w/v) stock of BDV-infected rat brain
468 homogenate, corresponding to 1000 focus-forming units of BDV. We used the fifth brain
469 passage in newborn rats of the Giessen strain He/80. To minimize reflux along the
470 injection tract, the needle was left in place for 20 seconds before being slowly
471 withdrawn.

472

473 **Isolation of brain mononuclear cells (BMCs).** BMCs were isolated by a method
474 adapted from previously described procedures [29,36,62]. Briefly, rats were deeply

475 anesthetized and perfused with 50 ml of PBS through the left ventricle to remove blood
476 from the organs. Brains were collected in Hank's buffered salt solution (HBSS)
477 containing 20 mM Hepes (HH) and dissociated using a glass Potter. Brain suspensions
478 were enzymatically digested for 1 hour at 37 °C in HH containing collagenase D (1
479 mg/ml), trypsin inhibitor (TLCK, 0.5 µg/ml) and DNase I (10 µg/ml). The digested
480 suspensions were filtered (70 µm cell strainer, Falcon), pelleted and resuspended in 30
481 ml of 30 % Percoll (Pharmacia). This solution was carefully placed on top of 10 ml of 70
482 % Percoll and centrifuged for 30 min at 2000 rpm at 20 °C. BMCs were collected at the
483 interface between the 30 % and 70 % Percoll layers, extensively washed with RPMI
484 1640 medium (Invitrogen) and directly used for FACS staining and cell sorting. Cell
485 suspensions were also prepared from the cervical lymph nodes of the same animals,
486 filtered as above, washed with PBS containing 5% fetal calf serum (FCS) and kept on
487 ice until FACS staining and cell sorting.

488
489 **Flow cytometry and cell sorting.** The monoclonal antibodies (mAbs) used were as
490 follows: PE-conjugated anti-rat TCRαβ (clone R73) (PharMingen, San Diego, CA); anti-
491 rat CD8β (clone 3.4.1) either FITC-conjugated (PharMingen, San Diego, CA) or Alexa
492 647-conjugated (Biolegend). For staining, BMCs or lymph node cells (LNC) were
493 suspended in FACS buffer (consisting of PBS with 5 % FCS) containing the different
494 mAbs and incubated for 20 min at 4 °C. After extensive washes with FACS buffer, CD8
495 T cells were sorted based on PE⁺ and (FITC^{high} or Alexa-647^{high}) expression using a
496 FACS Aria II-Sorp (BD Biosciences). The purity of the cells was always higher than 99
497 %. Flow cytometry data were collected on FACSCalibur or LSRII cytometers (BD
498 Biosciences) and analyzed using FlowJo software (TreeStar, version 8.8.6).

499
500 **Assessment of MHC I expression on neurons by flow cytometry.** Neurons grown on
501 35 mm dishes were washed with Tyrode's solution (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM
502 CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 25 mM Hepes, 30 mM glucose) prior to incubation at 4 °C for 45
503 min with 5 µg/ml of purified anti-Lewis MHC I antibody (RT1-A, clone OX18), under
504 gentle agitation. After several washes with Tyrode's solution, neurons were rapidly
505 detached from the dish using 0.5 % Trypsin, washed with PBS and blocked with PBS
506 containing 2.5 % FCS and 5 mM EDTA. The collected neurons were fixed and

507 permeabilized using Cytotfix/Cytoperm and Perm/Wash buffers (Becton Dickinson),
508 according to the manufacturer's instructions and processed for staining at room
509 temperature for 1 hour with anti-Tau antibody (Sigma-Aldrich). Neurons were washed
510 twice in Perm/Wash buffer before FACS analysis.

511
512 **Analysis of cytokine production.** IFN- γ levels were assessed by intra-cytoplasmic
513 staining, essentially as described [63]. Briefly, BMCs or LNC were stimulated by
514 coculture with irradiated Lewis fibroblasts (a gift from Pr. L. Stitz, Tübingen, Germany),
515 either infected or not with BDV, in complete RPMI 1640 medium containing 10 % FCS, 1
516 % sodium pyruvate, 1 % non essential amino acids, 1 % L-glutamine, 1 % penicillin-
517 streptomycin, 2×10^{-5} M 2-mercaptoethanol, and 50 U/ml recombinant human IL-2
518 (AbCys). After 24 hours, monensin (GolgiPlug 1 μ l/ml, BD Biosciences) was added in
519 the medium and cultures were further incubated overnight. Thereafter, cells were
520 labeled for membrane expression of TCR and CD8 β and for intra-cytoplasmic
521 production of IFN- γ using DB1-FITC mAb (a gift from Dr. P. Van der Meide, Rijswijk, The
522 Netherlands).

523 Cytokine levels were also measured in the supernatants as follows: directly after cell
524 sorting, CD8 T cells purified from the brain or lymph nodes (1.5×10^5 cells/well) were
525 incubated with BDV-infected or non-infected neurons grown in 96-well culture plates
526 (Falcon, Becton Dickinson). Forty-eight hours after coculture, cytokine production (IL-4,
527 IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- γ and TNF- α) was examined in the cell
528 supernatants by Luminex multiplex immunoassay (Millipore).

529
530 **Immunofluorescence.** Standard immunofluorescence was performed as described
531 previously [34]. Briefly, neurons grown on glass coverslips were fixed for 20 min at room
532 temperature with 4 % paraformaldehyde, permeabilized using PBS + 0.1 % Triton-X100
533 during 4 min, rinsed with PBS, and blocked overnight at 4 °C with PBS + 2 % normal
534 goat serum. Incubation for 1 h at room temperature or overnight at 4 °C with primary
535 antibodies was followed, after several washes in PBS, by a 1-h incubation at room
536 temperature with secondary antibodies. After extensive washing, coverslips were
537 mounted using ProLong Gold (Molecular Probes).

538

539 **RNA preparation and analysis.** Total RNA was isolated from highly purified CD8 T
540 cells using the RNeasy Minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Reverse transcription
541 was performed with 10 μ L of total RNA (5 to 10 ng), random hexamer primers (0.1 μ g)
542 (Gibco BRL), and SuperScript Reverse Transcriptase (200 U; Gibco BRL). cDNAs were
543 stored at -20 °C until use.

544 Quantitative cDNA amplification was performed according to manufacturer's
545 instructions. The products of polymerase chain reaction (PCR) LightCycler amplification
546 were detected with SYBR green I dye (Roche Diagnostics). PCR cycling conditions
547 were 50°C for 2 minutes and 95 °C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95 °C for 15
548 seconds, 60 °C for 1 minute, followed by the final melting curve program. The melting
549 curve analysis of PCRs together with their electrophoresis separation revealed the
550 presence of a single amplicon at the expected size. Each sample was run in duplicate
551 and mean values were used for quantitation.

552 Relative quantification of mRNA concentrations was performed with the standard curve
553 method, with amplification of target mRNA and actin mRNA for normalization. The
554 relative amount of mRNA in each sample was calculated as the ratio between the target
555 mRNA and the corresponding endogenous control actin mRNA.

556 The primers used were as follows. IFN- Γ : 5'-GCCAAGTTCGAGGTGAACAAC-3', 5'-
557 TTCATTGACAGCTTTGTGCTGG-3'; FasL: 5'-AAAAGCAAATAGCCAACCCAG-3', 5'-
558 AGCCTCATTGATCACAAGGCC-3'; GranzymeB: 5'-GACAGATGGCAGCAACTGAA-3',
559 5'-GGCAGAAGCATTCCATTCAT-3'; Perforin: 5'-GGAAGCAAACGTGCATGTGT-3', 5'-
560 GCGAAAACGTACATGCGACA-3'; β -actin 5'-TGGAAATCCTGTGGCATCCATGAAA-C-
561 3', 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'..

562
563 **Labeling of cells for imaging.** After cell sorting to high purity (> 98 %), CD8 T cells
564 were labeled with PKH26 red fluorescent cell linker kit (Sigma), according to the
565 manufacturer's instructions. Briefly, cells were stained with 4 μ M PKH-26 at room
566 temperature for 5 min, the reaction was stopped by adding FCS and cells were washed
567 once in complete RPMI medium containing 10 % FCS. In parallel, neurons grown on
568 Labtek chambered coverglass were labeled with 1 μ M calcein (Molecular Probes) in
569 neuronal medium for 30 min at 37°C. Neurons were then washed twice with Tyrode's
570 solution.

571

572 **Time-lapse confocal microscopy.** Fluorescence measurements and imaging were
573 performed on a Zeiss LSM-510 inverted confocal microscope with 10X, 20X or 40X
574 objectives, whilst maintaining the cells at 37 °C and 5 % CO₂. To minimize
575 photobleaching, one frame was captured every 20 s on average. Single-cell-tracking
576 analysis was performed automatically (intensity > 130 ± 20; size ≈ 10 μm) with Imaris
577 software. Image sequences of the time-lapse recordings were processed using
578 Metamorph and Imaris softwares and 3-D images were generated with Imaris.

579

580 **Quantification of axonal beading.** For each movie, the last picture in the green
581 channel (corresponding to neuronal staining) was subtracted from the first one (45 min
582 later) in order to obtain the difference in green fluorescence due to the formation of
583 beads between these two time points.

584

585 **Assessment of neuronal apoptosis.** After coculture with CD8 T cells, neurons were
586 washed with neuronal culture medium and labeled with Image-iT LIVE Green Caspase
587 Detection Kit (Molecular Probes) which provides FLICA reagent specific for caspase-3
588 and -7. Staining was performed according to the manufacturer's recommendations. At
589 different times after incubation, levels of fluorescence intensities were measured on
590 microscopic fields chosen at random.

591

592 **Electrophysiology.** Neuronal cortical cultures were prepared from embryonic Lewis
593 rats at gestational day 18 and seeded at a density of 10⁵ cells on multi-electrode arrays
594 (MEA, Multi Channel Systems GmbH, Reutlingen, Germany). Half of the MEA dishes
595 were infected with BDV on day 1. After addition of highly purified CD8 T cells (at a ratio
596 of one CD8 T cell per neuron), signals corresponding to the electrical activity from the
597 60 electrodes of the MEA were recorded using the MC Rack Software (Multi Channel
598 Systems GmbH, Reutlingen, Germany), which allows both online visualization and raw
599 data storage. The signal corresponding to the firing of a single action potential by a
600 neuron in the vicinity of an electrode was identified as a spike. We also detected high
601 frequency grouped spikes trains, known as bursts, which represent an important
602 parameter of the analysis of neuronal network activity [64]. Bursts were defined as a

603 series of more than 3 spikes occurring in less than 100 ms. Spikes and bursts were
604 detected by a dedicated analysis software developed at INSERM U862 (Bordeaux,
605 France) [38], which computes the signal obtained from the electrodes, calculates a
606 threshold and detects a spike every time the signal crosses this threshold with a
607 negative slope. The threshold was set to a minimum of three standard deviations of the
608 average noise amplitude computed over the whole recording and applied from the signal
609 averaged value as a baseline [65]. For each time point, recordings were performed over
610 a 3 min period, and the mean burst frequency was calculated by averaging the results
611 obtained for all electrodes.

612
613 **Data analysis.** Comparisons between groups were performed with different statistical
614 tests (Mann-Whitney or Kruskal-Wallis) using the GraphPad Prism software.

615

615

616 **Acknowledgments**

617

618 We thank the staff of the different platforms of our research center (Flow cytometry,
619 Imaging and animal housing) for excellent assistance that was instrumental for the
620 proper realization of this work. We thank Pr. U. Schneider for providing the BDV-
621 X(A6A7) mutant, O. Planz and L. Stitz for gift of Lewis fibroblasts, P. Van der Meide, for
622 the DB1 hybridoma and Pr. G. Kochs for gift of the Mx antibody. We thank A. Saoudi, L.
623 Mars, E. Joly, C. Malnou, A. Bétourné and N. Blanchard for critical reading of the
624 manuscript and insightful comments.

625 **Author contributions.** Conceived and designed the experiments: DGD, ES, GC, RL.
626 Performed the experiments: GC, ES, CM, VD, FF, GMB. Analyzed the data: GC, ES,
627 CM, DGD. Contributed reagents/materials/analysis tools: GLM. Wrote the paper: GC,
628 DGD.

629 **Funding.** This work was supported by a research grant from ARSEP and institutional
630 grants from Inserm and the CNRS (to DGD). The support of “réseau national des
631 génopôles (appel d’offres Affymetrix)” is also acknowledged. This work is part of the
632 Ph.D. thesis work of GC, who was supported by a doctoral fellowship from ARSEP. The
633 funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or
634 preparation of the manuscript.

635 **Competing interests.** The authors have declared that no competing interests exist.

636

636

637 **References**

638

- 639 1. Chakraborty S, Nazmi A, Dutta K, Basu A (2010) Neurons under viral attack: victims or warriors?
640 *Neurochemistry International* 56: 727-735.
- 641 2. Melzer N, Meuth SG, Wiendl H (2009) CD8+ T cells and neuronal damage: direct and collateral
642 mechanisms of cytotoxicity and impaired electrical excitability. *FASEB J* 23: 3659-3673.
- 643 3. Galea I, Bechmann I, Perry VH (2007) What is immune privilege (not)? *Trends Immunol* 28: 12-18.
- 644 4. Guidotti LG, Chisari FV (2001) Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive
645 immune response. *Annual Review of Immunology* 19: 65-91.
- 646 5. Binder GK, Griffin DE (2003) Immune-mediated clearance of virus from the central nervous system.
647 *Microbes Infect* 5: 439-448.
- 648 6. Decman V, Kinchington PR, Harvey SA, Hendricks RL (2005) Gamma interferon can block herpes
649 simplex virus type 1 reactivation from latency, even in the presence of late gene expression. *J*
650 *Virology* 79: 10339-10347.
- 651 7. Knickelbein JE, Khanna KM, Yee MB, Baty CJ, Kinchington PR, et al. (2008) Noncytotoxic lytic
652 granule-mediated CD8+ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency. *Science*
653 322: 268-271.
- 654 8. Joly E, Mucke L, Oldstone MB (1991) Viral persistence in neurons explained by lack of major
655 histocompatibility class I expression. *Science* 253: 1283-1285.
- 656 9. Patterson CE, Daley JK, Rall GF (2002) Neuronal survival strategies in the face of RNA viral infection.
657 *Journal of Infectious Diseases* 186 Suppl 2: S215-219.
- 658 10. Boulanger LM, Shatz CJ (2004) Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and
659 disease. *Nat Rev Neurosci* 5: 521-531.
- 660 11. Shatz CJ (2009) MHC class I: an unexpected role in neuronal plasticity. *Neuron* 64: 40-45.
- 661 12. Bien CG, Bauer J, Deckwerth TL, Wiendl H, Deckert M, et al. (2002) Destruction of neurons by
662 cytotoxic T cells: a new pathogenic mechanism in Rasmussen's encephalitis. *Annals of Neurology*
663 51: 311-318.
- 664 13. Neumann H, Cavalie A, Jenne DE, Wekerle H (1995) Induction of MHC class I genes in neurons.
665 *Science* 269: 549-552.
- 666 14. Medana I, Martinic MA, Wekerle H, Neumann H (2001) Transection of major histocompatibility
667 complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *American Journal of Pathology* 159:
668 809-815.
- 669 15. Meuth SG, Herrmann AM, Simon OJ, Siffrin V, Melzer N, et al. (2009) Cytotoxic CD8+ T cell-neuron
670 interactions: perforin-dependent electrical silencing precedes but is not causally linked to neuronal
671 cell death. *J Neurosci* 29: 15397-15409.
- 672 16. de la Torre JC (1994) Molecular biology of borna disease virus: prototype of a new group of animal
673 viruses. *J Virology* 68: 7669-7675.
- 674 17. Schneemann A, Schneider PA, Lamb RA, Lipkin WI (1995) The remarkable coding strategy of Borna
675 disease virus: a new member of the nonsegmented negative strand RNA viruses. *Virology* 210: 1-
676 8.
- 677 18. Ludwig H, Bode L (2000) Borna disease virus: new aspects on infection, disease, diagnosis and
678 epidemiology. *Rev Sci Tech* 19: 259-288.
- 679 19. Staeheli P, Sauder C, Hausmann J, Ehrensperger F, Schwemmler M (2000) Epidemiology of Borna
680 disease virus. *J Gen Virol* 81: 2123-2135.
- 681 20. Pletnikov M, Gonzalez-Dunia D, Stitz L (2002) Experimental infection: pathogenesis of
682 neurobehavioral disease. In: Carbone K, editor. *Borna disease virus and its role in*
683 *neurobehavioral disease*. Washington D.C.: ASM press. pp. 125-178.
- 684 21. Gonzalez-Dunia D, Volmer R, Mayer D, Schwemmler M (2005) Borna disease virus interference with
685 neuronal plasticity. *Virus Res* 111: 224-234.
- 686 22. Bode L, Ludwig H (2003) Borna disease virus infection, a human mental-health risk. *Clin Microbiol*
687 *Rev* 16: 534-545.
- 688 23. Ikuta K, Ibrahim MS, Kobayashi T, Tomonaga K (2002) Borna disease virus and infection in humans.
689 *Front Biosci* 7: 470-495.

- 690 24. Chalmers RM, Thomas DR, Salmon RL (2005) Borna disease virus and the evidence for human
691 pathogenicity: a systematic review. *Qjm* 98: 255-274.
- 692 25. Horie M, Honda T, Suzuki Y, Kobayashi Y, Daito T, et al. (2010) Endogenous non-retroviral RNA virus
693 elements in mammalian genomes. *Nature* 463: 84-87.
- 694 26. Belyi VA, Levine AJ, Skalka AM (2010) Unexpected inheritance: multiple integrations of ancient
695 bornavirus and ebolavirus/marburgvirus sequences in vertebrate genomes. *Plos Pathog* 6:
696 e1001030.
- 697 27. Deschl U, Stitz L, Herzog S, Frese K, Rott R (1990) Determination of immune cells and expression of
698 major histocompatibility complex class II antigen in encephalitic lesions of experimental Borna
699 disease. *Acta Neuropathol* 81: 41-50.
- 700 28. Stitz L, Bilzer T, Richt JA, Rott R (1993) Pathogenesis of Borna disease. *Arch Virol [Suppl]* 7: 135-
701 151.
- 702 29. Sobbe M, Bilzer T, Gommel S, Nöske K, Planz O, et al. (1997) Induction of degenerative brain lesions
703 after adoptive transfer of brain lymphocytes from Borna disease virus-infected rats: presence of
704 CD8+ T cells and perforin mRNA. *J Virol* 71: 2400-2407.
- 705 30. Stitz L, Bilzer T, Planz O (2002) The immunopathogenesis of Borna disease virus infection. *Front*
706 *Biosci* 7: d541-555.
- 707 31. Planz O, Bilzer T, Sobbe M, Stitz L (1993) Lysis of major histocompatibility complex class I-bearing
708 cells in Borna disease virus-induced degenerative encephalopathy. *J Exp Med* 178: 163-174.
- 709 32. Mozhayeva MG, Sara Y, Liu X, Kavalali ET (2002) Development of vesicle pools during maturation of
710 hippocampal synapses. *J Neurosci* 22: 654-665.
- 711 33. Prat CM, Schmid S, Farrugia F, Cenac N, Le Masson G, et al. (2009) Mutation of the protein kinase C
712 site in borna disease virus phosphoprotein abrogates viral interference with neuronal signaling
713 and restores normal synaptic activity. *PLoS Pathog* 5: e1000425.
- 714 34. Suberbielle E, Stella A, Pont F, Monnet C, Mouton E, et al. (2008) Proteomic analysis reveals
715 selective impediment of neuronal remodeling upon Borna disease virus infection. *J Virol* 82:
716 12265-12279.
- 717 35. Volmer R, Prat CM, Le Masson G, Garenne A, Gonzalez-Dunia D (2007) Borna disease virus
718 infection impairs synaptic plasticity. *J Virol* 81: 8833-8837.
- 719 36. Duplan V, Suberbielle E, Napper CE, Joly E, Saoudi A, et al. (2007) Tracking antigen-specific CD8+ T
720 cells in the rat using MHC class I multimers. *J Immunol Methods* 320: 30-39.
- 721 37. Robbins PA, McMichael AJ (1991) Immune recognition of HLA molecules downmodulates CD8
722 expression on cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 173: 221-230.
- 723 38. Berdondini L, Chiappalone M, van der Wal PD, Imfeld K, de Rooij NF, et al. (2006) A microelectrode
724 array (MEA) integrated with clustering structures for investigating in vitro neurodynamics in
725 confined interconnected sub-populations of neurons. *Sensors and Actuators B: Chemical* 114:
726 530-541.
- 727 39. Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H (2002) Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and
728 degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci* 25: 313-319.
- 729 40. Lassmann H (2010) Axonal and neuronal pathology in multiple sclerosis: what have we learnt from
730 animal models. *Experimental Neurology* 225: 2-8.
- 731 41. Liblau RS, Wong FS, Mars LT, Santamaria P (2002) Autoreactive CD8 T cells in organ-specific
732 autoimmunity: emerging targets for therapeutic intervention. *Immunity* 17: 1-6.
- 733 42. Coscoy L, Ganem D (2000) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes two proteins that block
734 cell surface display of MHC class I chains by enhancing their endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S*
735 *A* 97: 8051-8056.
- 736 43. Guerin JL, Gelfi J, Boullier S, Delverdier M, Bellanger FA, et al. (2002) Myxoma virus leukemia-
737 associated protein is responsible for major histocompatibility complex class I and Fas-CD95
738 down-regulation and defines scrapins, a new group of surface cellular receptor abductor proteins.
739 *J Virol* 76: 2912-2923.
- 740 44. Tortorella D, Gewurz BE, Furman MH, Schust DJ, Ploegh HL (2000) Viral subversion of the immune
741 system. *Annual Review of Immunology* 18: 861-926.
- 742 45. Delhaye S, Paul S, Blakqori G, Minet M, Weber F, et al. (2006) Neurons produce type I interferon
743 during viral encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7835-7840.
- 744 46. Diaz-Hernandez M, Hernandez F, Martin-Aparicio E, Gomez-Ramos P, Moran MA, et al. (2003)
745 Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's disease. *J Neurosci* 23: 11653-
746 11661.

- 747 47. Neumann H, Schmidt H, Cavalie A, Jenne D, Wekerle H (1997) Major histocompatibility complex
748 (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential
749 regulation by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. *Journal of*
750 *Experimental Medicine* 185: 305-316.
- 751 48. Sievers C, Platt N, Perry VH, Coleman MP, Conforti L (2003) Neurites undergoing Wallerian
752 degeneration show an apoptotic-like process with Annexin V positive staining and loss of
753 mitochondrial membrane potential. *Neuroscience Research* 46: 161-169.
- 754 49. Roediger B, Armati PJ (2003) Oxidative stress induces axonal beading in cultured human brain tissue.
755 *Neurobiology of Disease* 13: 222-229.
- 756 50. Zhang L, Deng T, Sun Y, Liu K, Yang Y, et al. (2008) Role for nitric oxide in permeability of
757 hippocampal neuronal hemichannels during oxygen glucose deprivation. *Journal of Neuroscience*
758 *Research* 86: 2281-2291.
- 759 51. Kilinc D, Gallo G, Barbee KA (2009) Mechanical membrane injury induces axonal beading through
760 localized activation of calpain. *Experimental Neurology* 219: 553-561.
- 761 52. Manning PT, Johnson EM, Jr., Wilcox CL, Palmatier MA, Russell JH (1987) MHC-specific cytotoxic T
762 lymphocyte killing of dissociated sympathetic neuronal cultures. *American Journal of Pathology*
763 128: 395-409.
- 764 53. McDole JR, Danzer SC, Pun RY, Chen Y, Johnson HL, et al. (2010) Rapid formation of extended
765 processes and engagement of Theiler's virus-infected neurons by CNS-infiltrating CD8 T cells.
766 *American Journal of Pathology* 177: 1823-1833.
- 767 54. Medana IM, Gallimore A, Oxenius A, Martinic MM, Wekerle H, et al. (2000) MHC class I-restricted
768 killing of neurons by virus-specific CD8+ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not
769 the perforin pathway. *European Journal of Immunology* 30: 3623-3633.
- 770 55. Rensing-Ehl A, Malipiero U, Irmeler M, Tschopp J, Constam D, et al. (1996) Neurons induced to
771 express major histocompatibility complex class I antigen are killed via the perforin and not the Fas
772 (APO-1/CD95) pathway. *European Journal of Immunology* 26: 2271-2274.
- 773 56. Chavez-Galan L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chavez R, Lascurain R (2009) Cell death
774 mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 6: 15-25.
- 775 57. Kagi D, Ledermann B, Burki K, Zinkernagel RM, Hengartner H (1996) Molecular mechanisms of
776 lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in
777 vivo. *Annual Review of Immunology* 14: 207-232.
- 778 58. Poenisch M, Burger N, Staeheli P, Bauer G, Schneider U (2009) Protein X of Borna disease virus
779 inhibits apoptosis and promotes viral persistence in the central nervous systems of newborn-
780 infected rats. *J Virol* 83: 4297-4307.
- 781 59. Nikic I, Merkler D, Sorbara C, Brinkoetter M, Kreutzfeldt M, et al. (2011) A reversible form of axon
782 damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nature Medicine*
783 17: 495-499.
- 784 60. Bajramovic JJ, Münter S, Syan S, Nerhbass U, Brahic M, et al. (2003) Borna disease virus
785 glycoprotein is required for viral dissemination in neurons. *J Virol* 77: 12222-12231.
- 786 61. Hans A, Bajramovic JJ, Syan S, Perret E, Dunia I, et al. (2004) Persistent, noncytolytic infection of
787 neurons by Borna disease virus interferes with ERK 1/2 signaling and abrogates BDNF-induced
788 synaptogenesis. *Faseb J* 18: 863-865.
- 789 62. Irani DN, Griffin DE (1991) Isolation of brain parenchymal lymphocytes for flow cytometric analysis.
790 Application to acute viral encephalitis. *J Immunol Methods* 139: 223-231.
- 791 63. Bernard I, Foucras G, Cautain B, van der Meide PH, Druet P, et al. (1998) Flow cytometric analysis of
792 intracellular interferon-gamma synthesis in rat CD4 T cells. *Eur Cytokine Netw* 9: 613-618.
- 793 64. Nakanishi K, Kukita F (1998) Functional synapses in synchronized bursting of neocortical neurons in
794 culture. *Brain Res* 795: 137-146.
- 795 65. Li X, Zhou W, Zeng S, Liu M, Luo Q (2007) Long-term recording on multi-electrode array reveals
796 degraded inhibitory connection in neuronal network development. *Biosensors and Bioelectronics*
797 22: 1538-1543.
- 798
799
800

800

801 **Figure legends**

802

803 **Figure 1.** BDV infection induces MHC I expression on neurons. (A),
804 Immunofluorescence analysis of non infected (NI) and (B), BDV-infected neurons, 14
805 days post infection with cell-free BDV. BDV Nucleoprotein was detected using a rabbit
806 polyclonal antibody, followed by an Alexa 488-coupled secondary antibody (green),
807 while β III-tubulin neuronal protein was detected using a mouse monoclonal antibody,
808 followed by an Alexa 594-coupled secondary antibody (red). (C) Representative dot plot
809 examples of MHC I and Tau expression in non infected (NI) or BDV-infected neurons.
810 (D) Data are represented as percentage of total Tau⁺ neurons expressing MHC I.
811 Results are expressed as means \pm sem of at least four independent experiments. ***,
812 $p < 0.005$ by Mann-Whitney *U*-test. (E) Representative fluorescence intensity profiles
813 (gated on MHC I⁺ and Tau⁺ neurons) between BDV-infected neurons (green), NI+IFN- β
814 neurons (blue) and NI+IFN- γ +TTX neurons (red).

815

816 **Figure 2.** Characteristics of brain-purified CD8 T cells from BDV-infected rats. (A)
817 Percentages of CD8⁺ versus CD4⁺ cells among TCR $\alpha\beta$ ⁺ cells purified from brain or
818 cervical lymph nodes of infected rats. (B) Determination by real-time quantitative RT-
819 PCR of the relative mRNA levels of IFN- γ , Granzyme B (GzmB) and Fas-ligand (FasL)
820 in brain-purified CD8 T cells compared to cervical lymph node CD8 T cells of the same
821 animal. Values were normalized for actin mRNA levels. Values are expressed as means
822 \pm sem of four independent experiments. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ by Mann-Whitney *U*-
823 test. (C) Percentage of IFN- γ -producing cells amongst TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8⁺ cells after 48h
824 restimulation with BDV-infected (BDV-Lew) or non-infected (NI-Lew) Lewis fibroblasts.
825 Results are expressed as means \pm sem of four independent experiments. *, $p < 0.05$; **,
826 $p < 0.01$ by by Mann-Whitney *U*-test. (D) Cytokine levels in supernatants of cocultures of
827 CD8 T cells with neurons. Supernatants were assayed after 48 hours of culture using
828 Luminex multiplex kits. Only levels of IFN- γ and IL-10 are shown (see Figure S3 for
829 other cytokines). Values are expressed as mean concentrations \pm sem of four
830 independent experiments. **, $p < 0.01$ by by Mann-Whitney *U*-test.

831

832 **Figure 3.** Quantitative analysis of CD8 T lymphocyte movement behavior in contact
833 with neurons. CD8 T cells purified from the brain of BDV-infected rats were labeled with
834 PKH-26 (red) and added to Calcein-AM labeled neurons (green) which were non-
835 infected (A) or infected (B) with BDV. Randomly chosen trajectories of individual cells
836 were automatically tracked using Imaris software. Trajectories are depicted as color-
837 coded tracks to represent increasing time, from blue (start of imaging) to yellow (end of
838 imaging). A representative imaging session of 15 min is shown in each case. (C),
839 Determination of average CD8 T cell velocities for different experimental conditions.
840 Dots represent average cell velocities of individual cells (200 to 700 cells analyzed
841 depending on the condition), red bars indicate mean values. Analyses were performed
842 using non-infected neurons (NI), non-infected neurons treated for 48 h with IFN- γ +TTX,
843 BDV-infected neurons or BDV-infected neurons treated with a neutralizing MHC I
844 monoclonal antibody 1 h prior to washes and addition of CD8 T cells. Values are
845 expressed as means \pm sem. P values were calculated using Kruskal-Wallis test. ***,
846 $p < 0.001$. (D) Relative frequencies of brain CD8 T cells as a function of their individual
847 mean velocities, under the different conditions of culture. Arrows point to the mean
848 velocity for each condition.

849
850 **Figure 4.** Interaction with brain-purified CD8 T cells induces early morphological
851 changes of BDV-infected neurons. (A) BDV-infected neuronal network loaded with
852 calcein AM (green) prior to and (B) 45 min after coculture with PKH-26 stained brain-
853 derived CD8 T cells. (C) Quantification of calcein leakage was performed by subtracting
854 green channel fluorescence levels of the last picture from that of the first one in a 45 min
855 movie. Differences in fluorescence values are expressed as arbitrary units. Values are
856 expressed as means \pm sem of at least 5 independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$
857 by Mann-Whitney *U*-test.

858
859 **Figure 5.** Incubation with brain-derived CD8 T cells induces an early increase in
860 electrical activity, later followed by neuronal death. (A) Representative view of cortical
861 neurons cultured in an MEA dish. Electrodes are spaced by 200 μm ; electrode diameter
862 is 30 μm . Original magnification, X50. (B) Quantitative analysis of the mean burst
863 frequency for non-infected (NI) neurons and BDV-infected neurons upon coculture with

864 brain CD8 T cells (at a ratio of 1:1). The mean burst frequency was first calculated under
865 spontaneous conditions and at various times after the beginning of coculture. For each
866 condition, data were acquired from 100 to 460 electrodes, from five independent
867 experiments. Values are expressed as means \pm sem *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ by Mann-
868 Whitney *U*-test. (C). Quantitative analysis of neuronal apoptosis following incubation
869 with brain CD8 T cells (at a ratio of 1:1). Apoptosis was measured using the fluorescent
870 probe FLICA, and levels of VAD-FMK fluorescence were determined of 5 randomly-
871 selected fields for each condition. This analysis was performed upon incubation for 2
872 (white bars) or 4 (black bars) hours with brain purified CD8 T cells using non-infected
873 neurons, BDV-infected neurons, or BDV-infected neurons treated with a neutralizing
874 MHC I monoclonal antibody 1 h prior to washes and addition of CD8 T cells. Values are
875 expressed as means \pm sem from 5 separate experiments. ***, $p < 0.001$ by Mann-
876 Whitney *U*-test.

877
878

879 **Supporting Information**

880

881 **Table S1.** List of interferon-stimulated genes that are upregulated in BDV-infected
882 neurons, based on microarray analyses.

883

884 **Figure S2.** Determination by real-time quantitative RT-PCR of the relative mRNA levels
885 of Perforin in brain-purified CD8 T cells compared to cervical lymph node CD8 T cells of
886 a naïve animal. Values were normalized for actin mRNA levels. Values are expressed
887 as means \pm sem of four independent experiments.

888

889 **Figure S3.** Cytokine levels for IL-6, IL-17 and TNF- α in supernatants of cocultures of
890 CD8 T cells with neurons. Supernatants were assayed after 48 hours of culture using
891 Luminex multiplex kits. Levels of IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 were below the detection
892 threshold of our assay (4.88 pg/ml). Values are expressed as mean concentrations \pm
893 sem of four independent experiments. **, $p < 0.01$ by Mann-Whitney *U*-test.

894

895 **Figure S4.**

896
897 **Figure S5.** Neurons infected with the BDV-X(A6A7) mutant do not exhibit significant
898 change in the susceptibility to apoptosis triggered by CD8 T cells. Neuronal apoptosis
899 was quantified as described in Fig. 5, following incubation for 3 hours with brain CD8 T
900 cells (at a ratio of 1:1). Levels of VAD-FMK fluorescence were determined of 5
901 randomly-selected fields for each condition. This analysis was performed upon
902 incubation of brain purified CD8 T cells with non-infected neurons, neurons infected with
903 wild-type BDV or the BDV-X(A6A7) mutant, as well as BDV-infected neurons treated
904 with a neutralizing MHC I monoclonal antibody 1 h prior to washes and addition of CD8
905 T cells. One representative experiment out of two is shown.

906
907 **Supplementary Movie 1.** CD8 T cells purified from the brains of BDV infected rats were
908 labeled with PKH-26 (red) and added to calcein-loaded, non-infected neurons. Movie
909 was based on one image capture every 20 s using a 10X objective. A representative 30
910 min sequence is shown. Note the highly mobile and scanning behavior of CD8 T cells.
911 Movie accelerated 153X.

912
913 **Supplementary Movie 2.** CD8 T cells purified from the brains of BDV infected rats were
914 labeled with PKH-26 (red) and added to calcein-loaded, BDV-infected neurons. Movie
915 was based on one image capture every 20 s using a 10X objective. A representative 30
916 min sequence is shown. Note the progressive arrest of CD8 T cells in contact with
917 neurons. Movie accelerated 137X.

918
919 **Supplementary Movie 3.** PKH-26-labeled brain-derived CD8 T cells were added to
920 calcein-loaded, non-infected neurons and examined with a 20X objective. Movie was
921 based on one image capture every 20 s. A representative 20 min sequence is shown,
922 during which no changes resulting from CD8 T cell scanning were noted on the neuronal
923 network. Movie accelerated 80X.

924
925 **Supplementary Movie 4.** PKH-26-labeled brain-derived CD8 T cells were added to
926 calcein-loaded, BDV-infected neurons and examined with a 20X objective. Movie was

927 based on one image capture every 20 s. A representative 16 min sequence is shown, to
928 illustrate leakage of calcein staining from neurons. Movie accelerated 80X

929

930 **Supplementary Movie 5.** 4-D reconstruction using Imaris software (38 minute-capture
931 movie, accelerated 280 x) of the interaction between brain-derived CD8 T cells and
932 infected neurons, similar to that shown on movie S4.

933

934 **Supplementary Movie 6.** Long-term analysis of brain-derived CD8 T cell interaction
935 with BDV-infected neurons was analyzed using a temperature and CO₂-controlled wide-
936 field microscope coupled to a CCD camera. Interaction was followed for over 8 hours, to
937 visualize the delayed and progressive collapse of the neuronal network upon CTL
938 engagement.

939

940

941

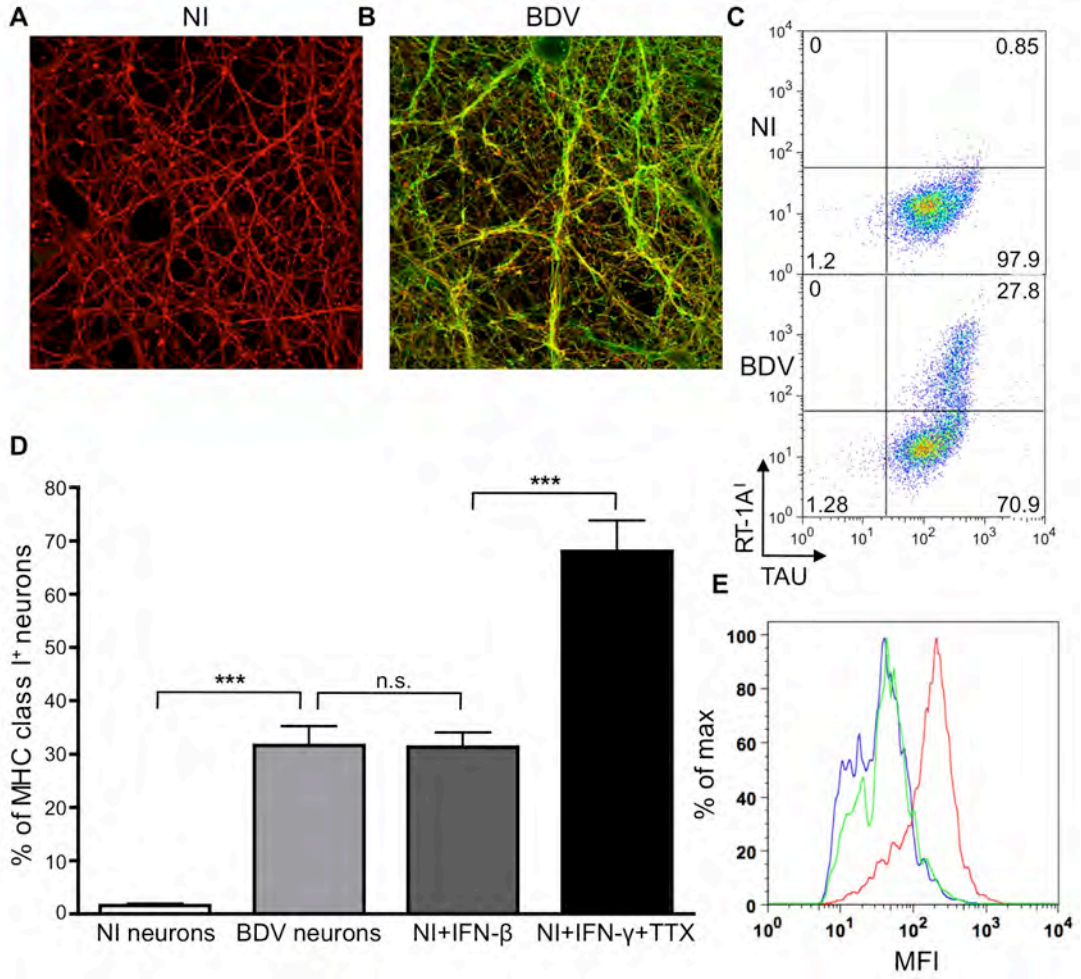
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958

FIGURES

958

959 **Figure 1**

960



961

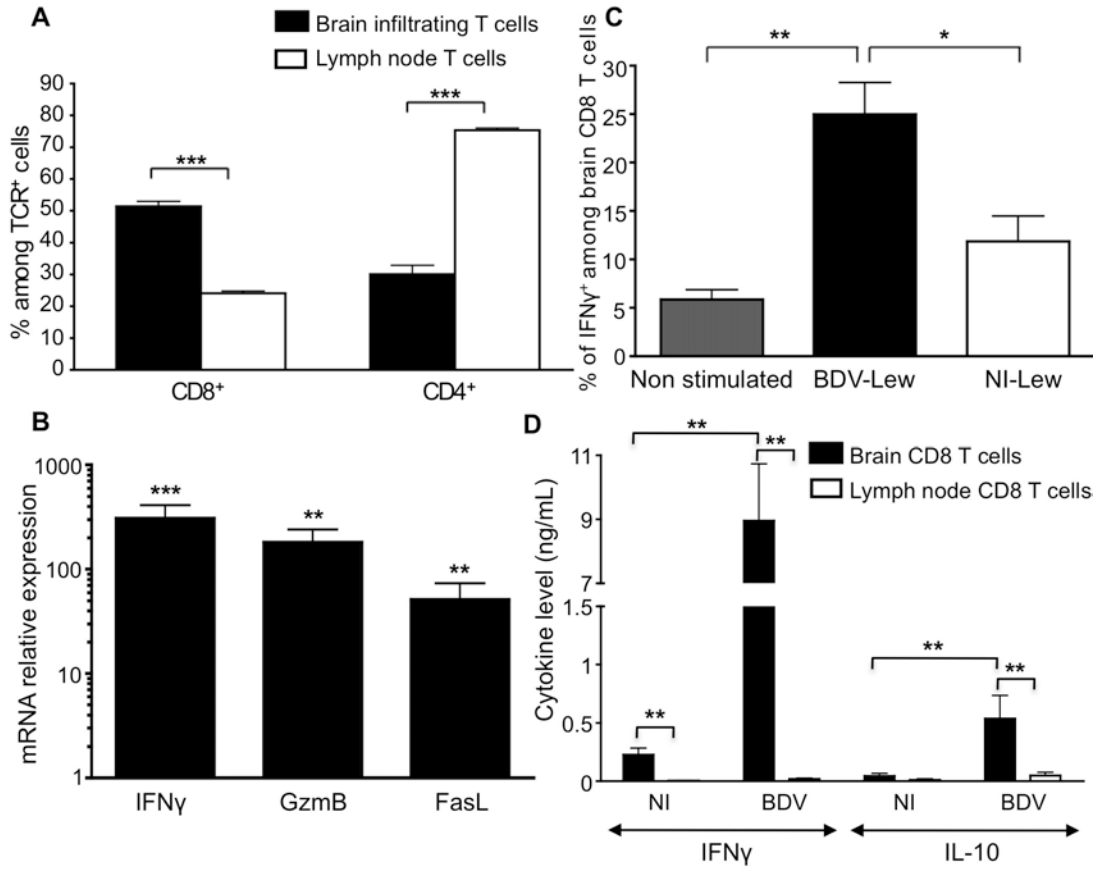
962

963

963

964 **Figure 2**

965



966

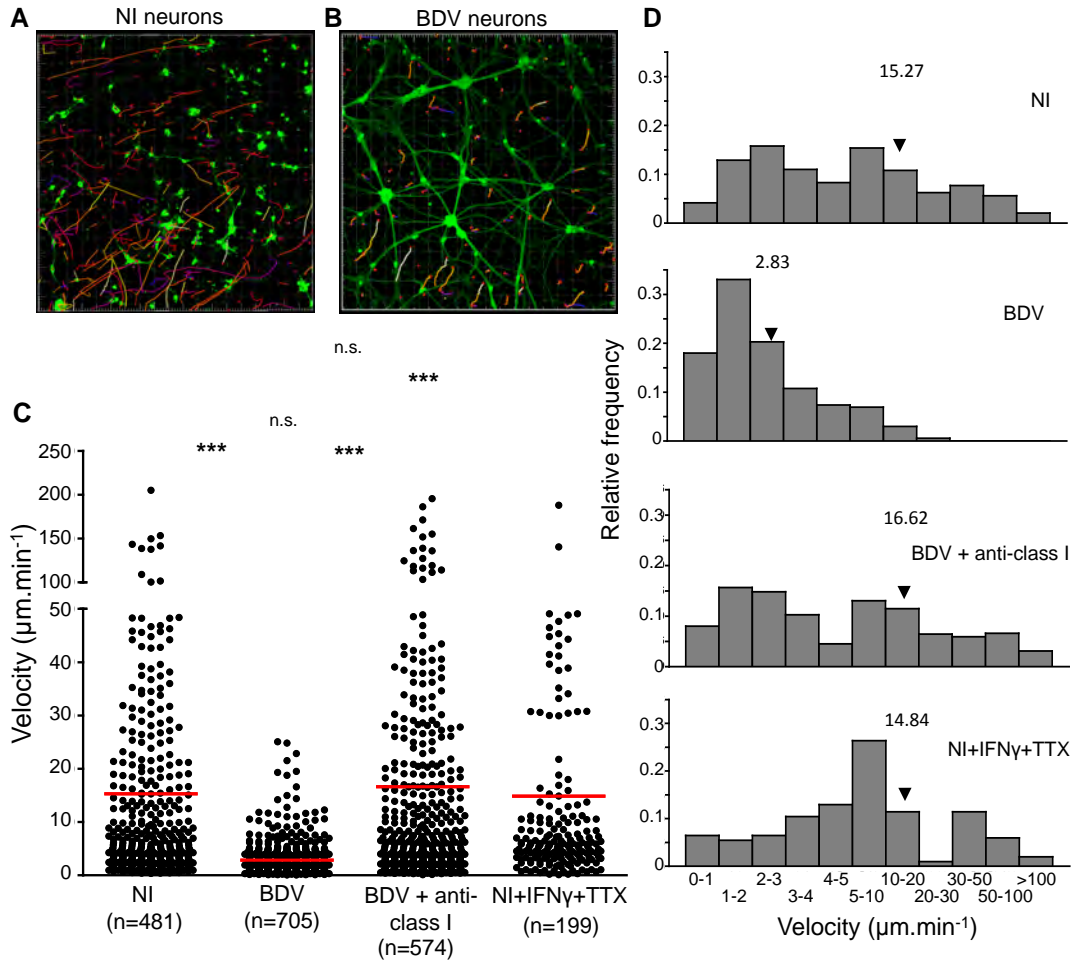
967

968

968

969 **Figure 3**

970



971

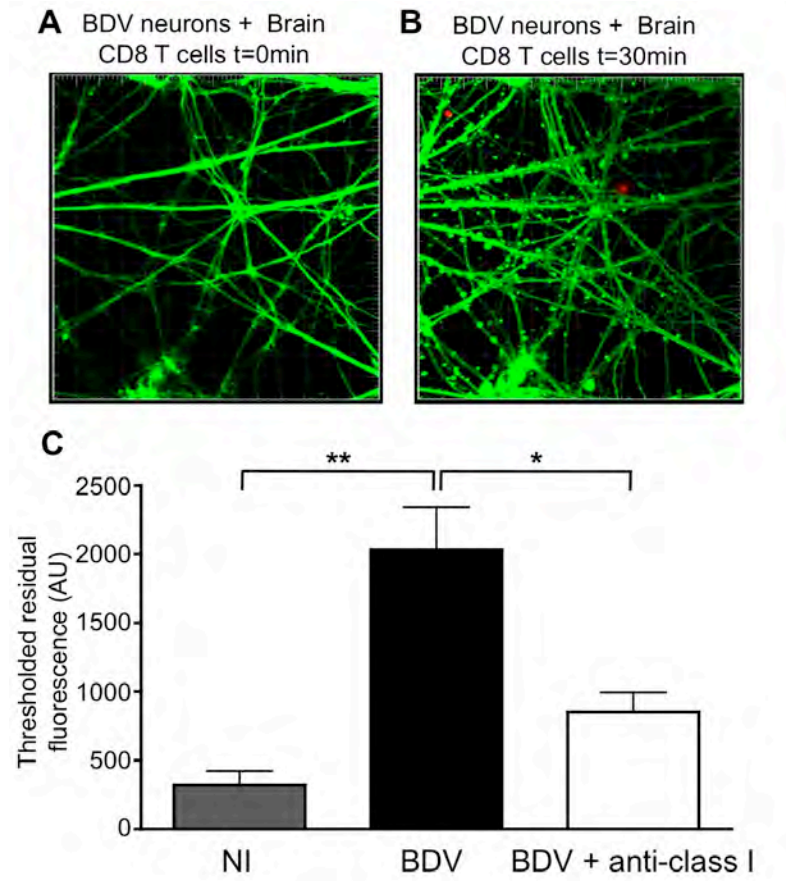
972

973

973

974 **Figure 4**

975



976

977

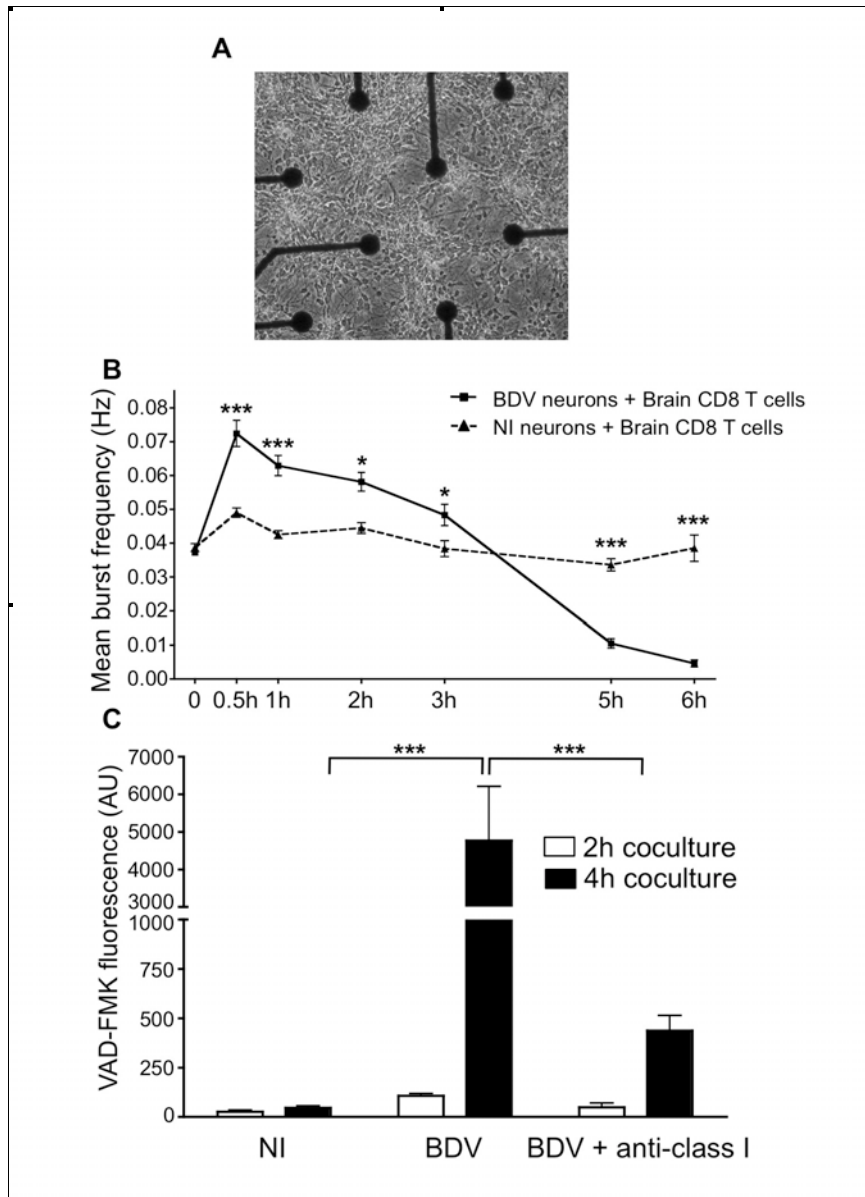
978

979

979

980 **Figure 5**

981



982

983

983

984 **Table S1**

List of the genes upregulated in BDV-infected neurons and identified by microarray analysis. The table shows only the known genes for which the difference between control (non-infected) and BDV-infected neurons was of more than 2-fold. Genes indicated in bold characters belong to the family of interferon-stimulated genes

Gene product	Full name and/or description	Fold BDV/NI	Affymetrix N°
Best5	Bone-expressed sequence tag 5 (Viperin)	18.78	1370913_at
GIP-2	Interferon α-inducible protein (clone IFI-15K)	12.47	1382314_at
USP18	Ubiquitin specific protease 18 (UBP43)	11.18	1389034_at
Gal-9	Galectin-9 (lectin galactose binding soluble 9)	7.97	1387027_at
	Interferon-inducible GTPase	7.40	1373992_at
RTP4	28kD interferon responsive protein	6.33	1379285_at
Ifitm-3	Interferon induced transmembrane protein 3	6.19	1387995_at
MHC1b	MHC class Ib RT1.S3	4.75	1388212_at
Oas1i	2'-5' oligoadenylate synthetase II	4.73	1391754_at
Oas1	2'-5' oligoadenylate synthetase 1	4.34	1371152_at
ISG12(a)		4.34	1387770_at
PARP9	poly (ADP-ribose) polymerase family member 9	3.99	1376144_at
Mx1	Myxovirus (influenza virus) resistance 1	3.58	1371015_at
	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	2.98	1391463_at
IF-1	Interferon inducible protein 1	2.93	1391489_at
Ubce8	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	2.87	1373037_at
IF1644	Interferon-induced protein 44	2.78	1381014_at
Trim25	Tripartite motif protein 25	2.66	1374731_at
	Galectin-3 binding protein	2.38	1387946_at
Ifih1	Interferon induced with helicase C domain 1	2.33	1385276_at
ISGF3γ	Interferon dependent positive acting transcription factor 3 γ	2.32	1383448_at
Mx2	Myxovirus (influenza virus) resistance 2	2.32	1387283_at
IF-35	Interferon-induced protein 35	2.30	1374551_at
IRF-7	Interferon regulatory factor 7	2.30	1383564_at
PARP14	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	2.28	1372034_at
Bst2	Bst2/DAMP-1	2.24	1390738_at
	flt3 ligand	2.24	1379228_at
Rpl39	Ribosomal protein L39	2.18	1367934_at
Stat1	Signal transducer and activator of transcription 1	2.16	1368835_at
	Interferon gamma induced GTPase	2.11	1396163_at
Unc5-B	unc-5 homolog B (netrin receptor)	2.10	1373701_at
	Interferon inducible GTPase 1	2.09	1377950_at
	Transcriptional regulator protein	2.06	1383441_at
CRBP1	Cellular retinol binding protein 1	2.05	1367939_at
HCA127	hepatocellular carcinoma-associated antigen 127	2.04	1395492_at
Tpcn2	Two-pore calcium channel protein 2	2.04	1383589_at
TNFRSF6	Fas associated factor 1	2.03	1374360_at

985

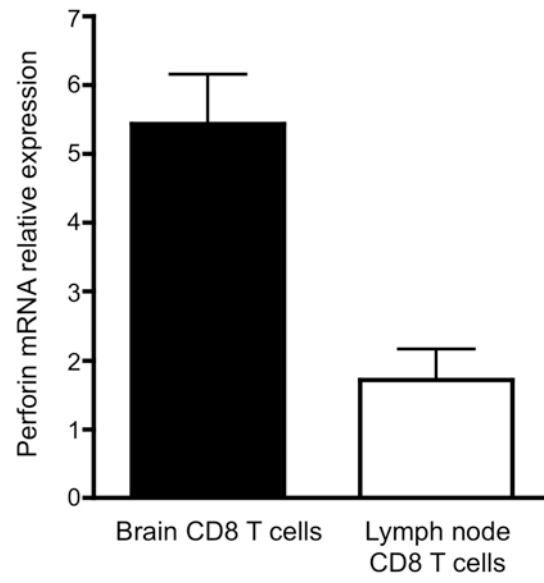
986

986

987

988 **Figure S2.**

989

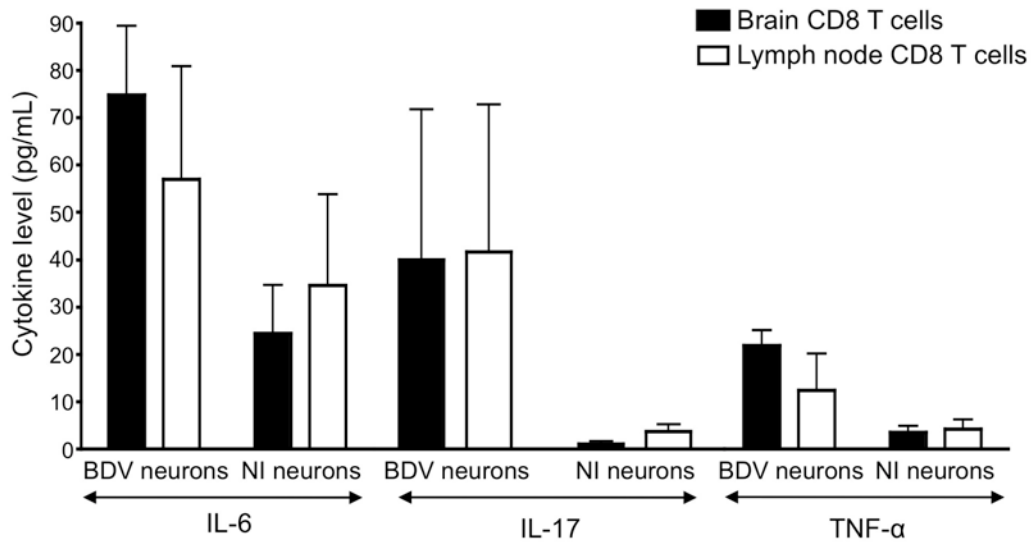


990

991

991

992 **Figure S3.**



993

994

995

995

996

997 **Figure S4**

998

999

1000

1001

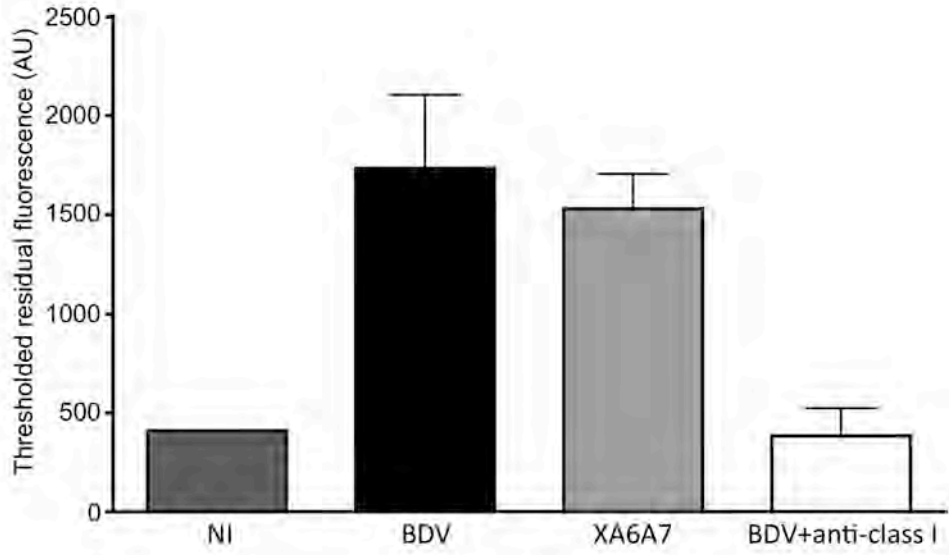
1002

1003

1003

1004 **Figure S5**

1005



1006

RÉSUMÉ

Les lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CTL) sont aujourd'hui considérés comme des acteurs clés dans diverses pathologies neuroinflammatoires ou neurodégénératives, telles que la sclérose en plaques, l'encéphalite de Rasmussen ou la maladie d'Alzheimer. On présume qu'ils participent aux lésions neuronales observées dans ces pathologies bien que leur contribution précise reste à déterminer. En effet, la possibilité que les neurones puissent représenter une cible pour les CTL reste controversée, notamment parce que les neurones expriment peu de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) en conditions physiologiques.

Dans ce contexte, l'objectif général de ma thèse était donc d'analyser les interactions entre CTL et neurones, ainsi que leurs conséquences, au moyen d'un modèle original de neuroinflammation.

Pour cela, j'ai utilisé le modèle de neuroinflammation induite par l'infection avec le virus de Borna (BDV). L'infection intracérébrale du rat Lewis avec ce virus neurotrope, absolument non cytolitique aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, est connue pour induire une inflammation médiée par les CTL. Les CTL purifiés à partir du cerveau de rats infectés sont incubés *ex vivo* avec des cultures primaires de neurones corticaux de rats Lewis, préalablement infectées par le BDV. Ainsi, j'ai pu analyser la dynamique et les conséquences de l'interaction entre CTL et neurones, en utilisant notamment des techniques d'imagerie en temps réel.

D'une part, j'ai pu observer que l'infection par le BDV induit l'expression de CMH-I à la surface des neurones, les rendant potentiellement susceptibles à l'attaque par les CTL. D'autre part, les CTL sont préférentiellement recrutés dans le cerveau des rats infectés et surexpriment fortement des effecteurs cytolitiques en terme d'ARNm. De plus, suite à l'incubation avec des neurones infectés, les CTL purifiés à partir du cerveau peuvent sécréter de l'IFN- γ , alors que ce n'est pas le cas suite à une stimulation avec des neurones non infectés ou lorsque les CTL sont purifiés à partir de la périphérie.

Par la suite, l'enregistrement en temps réel des interactions CTL-neurones a révélé que la mobilité des CTL est sévèrement réduite, et ce de façon dépendante de l'interaction avec le complexe CMH-I/antigène viral, suggérant une interaction spécifique avec les neurones. En outre, l'observation de neurones marqués à la calcéine a permis de montrer des changements rapides de la morphologie neuronale, dépendant encore une fois du CMH-I.

Afin d'étudier les propriétés électrophysiologiques des neurones pendant cette attaque par les CTL, nous avons enregistré l'activité électrique de réseaux de neurones corticaux mis en culture sur des supports à électrodes multiples en collaboration avec le Pr. Le Masson (Inserm U862). De façon surprenante, l'analyse fonctionnelle des neurones montre que le réseau neuronal reste électriquement actif durant cette période. De plus, les neurones semblent assez résistants à l'attaque par les CTL puisque l'activation des caspases 3 et 7, indiquant l'induction de l'apoptose, n'est détectée qu'au bout de 4 heures de co-incubation.

Dans leur ensemble, ces données suggèrent que la dynamique de l'attaque neuronale par les CTL semble être différente de celle d'une cible conventionnelle.