

Université de Montréal

**Rôle des cellules endothéliales dans l'immunité innée précoce induite lors d'infections  
par des coronavirus murins**

par

Christian Bleau

Département de microbiologie et immunologie  
Faculté de médecine

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

Août, 2015

© Christian Bleau, 2015

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Rôle des cellules endothéliales dans l'immunité innée précoce induite lors d'infections  
par des coronavirus murins**

Présentée par :  
Christian Bleau

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre. Mariela Segura  
(présidente-rapporteuse)

Dre. Lucie Lamontagne  
(directrice de recherche)

Dr. Marc Bilodeau  
(membre du jury)

Dre. Tatiana Scorza  
(examinatrice externe)

Dre. Nathalie Arbour  
(représentante du doyen de la FES)

## RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Les cellules endothéliales (EC) constituent une première barrière physique à la dissémination de virus pléiotropiques circulant par voie hématogène mais leur contribution à la défense innée anti-virale est peu connue. Des dysfonctions des EC de la barrière hémato-encéphalique (BMEC) et des sinusoides hépatiques (LSEC) ont été rapportées dans des neuropathologies et des hépatites aiguës ou chroniques d'origine virale, suggérant que des atteintes à leur intégrité contribuent à la pathogenèse. Les sérotypes de coronavirus de l'hépatite murine (MHV), se différenciant par leur capacité à induire des hépatites et des maladies neurologiques de sévérité variable et/ou leur tropisme pour les EC, représentent des modèles viraux privilégiés pour déterminer les conséquences de l'infection des EC sur la pathogenèse virale. Lors d'infection par voie hématogène, le sérotype MHV3, le plus virulent des MHV, induit une hépatite fulminante, caractérisée par une réponse inflammatoire sévère, et des lésions neurologiques secondaires alors que le sérotype moins virulent, MHV-A59, induit une hépatite modérée sans atteintes secondaires du système nerveux central (SNC). Par ailleurs, le sérotype MHV3, à la différence du MHV-A59, démontre une capacité à stimuler la production de cytokines par la voie TLR2. Les variants atténués du MHV3, les virus 51.6-MHV3 et YAC-MHV3, sont caractérisés par un faible tropisme pour les LSEC et induisent respectivement une hépatite modérée et subclinique. Compte tenu de l'importance des LSEC dans le maintien de la tolérance hépatique et de l'élimination des pathogènes circulants, il a été postulé que la sévérité de l'hépatite et de la réponse inflammatoire lors d'infections par les MHV est associée à la réplication virale et à l'altération des propriétés tolérogéniques et vasculaires des LSEC. Les désordres inflammatoires hépatiques pourraient résulter d'une activation différentielle du TLR2, plutôt que des autres TLR et des hélicases, selon les sérotypes. D'autre part, compte tenu du rôle des BMEC dans la prévention des infections du SNC, il a été postulé que l'invasion cérébrale secondaire par les coronavirus est reliée à l'infection des BMEC et le bris subséquent de la barrière hémato-encéphalique (BHE). À l'aide d'infections *in vivo* et *in vitro* par les différents sérotypes MHV, chez des souris ou des cultures de BMEC et de LSEC, nous avons démontré, d'une part, que l'infection *in vitro* des LSEC par le sérotype MHV3, à la différence des variants 51.6- et YAC-MHV3, altérerait la production du facteur vasodilatant NO

et renversait leur phénotype tolérogénique en favorisant la production de cytokines et de chimiokines inflammatoires. Ces dysfonctions se traduisaient *in vivo* par une réponse inflammatoire incontrôlée et une dérégulation du recrutement intrahépatique de leucocytes, favorisant la réplication virale et les dommages hépatiques. Nous avons aussi démontré, à l'aide de souris TLR2 KO et de LSEC dont l'expression du TLR2 a été abrogée par des siRNA, que la sévérité de l'hépatite et de la réponse inflammatoire induite par le sérotype MHV3, dépendait en partie de l'induction et de l'activation préférentielle du TLR2 par le virus dans le foie. D'autre part, la sévérité de la réplication virale au foie et des désordres dans le recrutement leucocytaire intrahépatique induits par le MHV3, et non par le MHV-A59 et le 51.6-MHV3, corrélaient avec une invasion virale subséquente du SNC, au niveau de la BHE. Nous avons démontré que l'invasion cérébrale du MHV3 était associée à une infection productive des BMEC et l'altération subséquente des protéines de jonctions serrées ocludine, VE-cadhérine et ZO-1 se traduisant par une augmentation de la perméabilité de la BHE et l'entrée consécutive du virus dans le cerveau.

Dans l'ensemble, les résultats de cette étude mettent en lumière l'importance du maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle des LSEC et des BMEC lors d'infections virales aiguës par des MHV afin de limiter les dommages hépatiques associés à l'induction d'une réponse inflammatoire exagérée et de prévenir le passage des virus au cerveau suite à une dissémination par voie hématogène. Ils révèlent en outre un nouveau rôle aggravant pour le TLR2 dans l'évolution de l'hépatite virale aiguë ouvrant la voie à de nouvelles avenues thérapeutiques visant à moduler l'activité inflammatoire du TLR2.

**MOTS CLÉS :** Coronavirus, virus de l'hépatite murine (MHV), hépatite aiguë, inflammation, réponse immune innée, cellules endothéliales des sinusoides hépatiques, cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux, IFN- $\beta$ , TLR2, cytokines, chimiokines, NK, NK-T, neutrophiles

## ABSTRACT

Endothelial cells (EC) act as a physical barrier against invasion by pleiotropic blood borne viruses but their contribution in innate antiviral defense is poorly known. Dysfunctions in blood-brain barrier EC (BMECs) and liver sinusoidal EC (LSECs) have been reported in viral neuropathologies and hepatitis, suggesting that loss of ECs integrity may contribute to the pathogenesis. Mouse hepatitis coronaviruses (MHV), differing in their ability to induce severe to subclinical hepatitis and neurological diseases and / or their tropism for ECs, are relevant viral models to study the consequences of EC infection in viral pathogenesis. Following hematogenous infection, the MHV3 serotype, the most virulent MHV, induces fulminant hepatitis, characterized by severe inflammatory response, followed by neurological damage whereas the less virulent MHV-A59 serotype induces milder hepatitis but does not invade the central nervous system (CNS). In addition, MHV3, in contrast to MHV-A59, shows ability to induce TLR2-dependent cytokine response. The attenuated MHV3 variants, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3, are characterized by a weak tropism for LSECs and induce moderated and subclinical hepatitis respectively. Given the importance of LSECs in hepatic tolerance and the elimination of circulating pathogens, it has been postulated that the severity of hepatitis and inflammatory response induced by MHVs correlates with infection and alterations in vascular and tolerogenic properties of LSECs. Hepatic inflammatory disorders may result from differential activation of TLR2, rather than other TLRs and helicases, according to serotypes. Moreover, given the role of BMECs in preventing CNS infections, it has been postulated that secondary cerebral invasion by coronaviruses is related to infection of BMECs and subsequent breakdown of the blood-brain barrier (BBB). Through *in vitro* and *in vivo* infections of isolated BMECs, LSECs or mice with the different MHVs, we demonstrated, first, that *in vitro* productive infection of LSECs by the highly virulent MHV3 serotype, in contrast to 51.6- et YAC-MHV3 variants, altered their production of vasoactive factors and overthrew their intrinsic tolerogenic properties by promoting inflammatory cytokines and chemokines production. These disturbances were reflected *in vivo* by an uncontrolled inflammatory response and a deregulation of intrahepatic leukocyte recruitment, favoring viral replication and liver damages. We demonstrated, using TLR2 KO mice and LSECs treated with siRNA

for TLR2 that the abnormal inflammatory response induced by MHV3 depended in part on preferential induction and activation of TLR2 by the virus on the surface of hepatic cells. Moreover, the severity of the primary viral replication in the liver and disorders in intrahepatic leucocyte recruitment induced by MHV3, but not by MHV-A59 and 51.6-MHV3, correlated with a subsequent brain invasion at the BBB level. Such invasion was related to productive infection of BMECs and subsequent IFN- $\beta$ -dependent disruption of tight junction proteins occludin, VE-cadherin and ZO-1, resulting in an increase of BBB permeability and further viral entry into the CNS.

Overall, the results of this study highlight the importance of structural and functional integrity of LSECs and BMECs during acute viral infections by MHVs to limit liver damages associated with viral-induced exacerbation of inflammatory response and prevent brain invasion by MHVs following viral spread through the bloodstream. They also reveal a new worsening role for TLR2 in the evolution of acute viral hepatitis paving the way for new therapies targeting TLR2-induced inflammatory activity.

**KEY WORDS :** Coronavirus, mouse hepatitis viruses (MHV), acute hepatitis, innate immune response, liver sinusoidal endothelial cells, brain microvascular endothelial cells, TLR2, IFN- $\beta$ , cytokines, chemokines, NK, NK-T, neutrophils.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ EN FRANÇAIS</b> .....	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IV</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>XXIII</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>XXXI</b>
<b>1- INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>2- REVUE DE LA LITTÉRATURE</b> .....	<b>4</b>
2.1- Les infections virales neurologiques .....	5
2.1.1- Structure du système nerveux central.....	5
2.1.2- Neuropathologies causées par des infections virales du SNC.....	6
2.1.3- Mécanismes d'entrée des virus dans le SNC .....	9
2.2- La barrière hémato-encéphalique (BHE).....	10
2.2.1- Structure et fonction de la BHE .....	11
2.2.2- Caractéristiques des cellules des micro-vaisseaux cérébraux (BMEC) .....	12
2.3- Les infections virales hépatiques.....	16
2.3.1- Structure et fonctions du foie .....	17
2.3.2- L'ambivalence immunitaire du foie : tolérance versus immunité.....	18
2.3.3- Fonctions des cellules hépatiques .....	18
2.3.4- Les hépatites virales .....	27
2.3.5- Dysfonctions des LSEC induites lors d'hépatites virales.....	30
2.4- Les mécanismes de l'immunité innée dans le foie .....	31
2.4.1- Les récepteurs Toll (TLR).....	31
2.4.2- Les récepteurs de type hélicase (RLR).....	36
2.4.3- Les alarmines.....	37
2.5- Les coronavirus (CoV) .....	38
2.5.1- Historique et classification .....	38
2.5.2- Pathologies causées par les CoV .....	39
2.5.3- Structure des CoV .....	41
2.5.4- Réplication des CoV.....	44
2.6- Les virus de l'hépatite murine (MHV) .....	46

2.6.1-	Sérotypes et pathologies.....	47
2.6.2-	Le récepteur des MHV .....	48
2.6.3-	Le tropisme cellulaire des MHV .....	49
2.6.4-	Mécanismes d'entrée des MHV .....	51
2.6.5-	Le virus de l'hépatite murine de type 3 (MHV3).....	52
2.7-	Hypothèses .....	63
<b>3-</b>	<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>67</b>
3.1-	<b>Article 1 :</b> Mouse hepatitis virus infection reverts liver sinusoidal endothelial cell tolerogenic functions in acute hepatitis. ....	68
3.1.1-	Abstract .....	70
3.1.2-	Introduction .....	71
3.1.3-	Material and Methods.....	73
3.1.4-	Results .....	79
3.1.5-	Discussion .....	103
3.1.6-	Acknowledgements .....	109
3.2-	<b>Article 2 :</b> Toll-like receptor (TLR)-2 exacerbates murine viral hepatitis.....	110
3.2.1-	Abstract .....	113
3.2.2-	Introduction .....	113
3.2.3-	Material and methods .....	116
3.2.4-	Results .....	121
3.2.5-	Discussion .....	141
3.2.6-	Acknowledgments .....	147
3.3-	<b>Article 3 :</b> Brain invasion by mouse hepatitis virus depends on impairment of tight junctions and interferon- $\beta$ production in brain microvascular endothelial cells.....	148
3.3.1-	Abstract .....	151
3.3.2-	Introduction .....	152
3.3.3-	Material and methods .....	154
3.3.4-	Results .....	159
3.3.5-	Discussion .....	175
3.3.6-	Acknowledgements .....	180
<b>4-</b>	<b>DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>181</b>
4.1-	Rôles des anomalies fonctionnelles des LSEC et de l'activation du TLR2 dans la sévérité de l'hépatite aiguë causée par le MHV3.....	183
4.2-	Rôle des anomalies fonctionnelles et structurales des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (BHE) dans l'invasion cérébrale du MHV3 lors d'infection aiguë .....	191
4.3-	Contribution des résultats de la recherche pour la compréhension des infections par les coronavirus humains et les virus d'hépatites humaines .....	196



4.4- Conclusion et perspectives .....	203
<b>5- RÉFÉRENCES.....</b>	<b>205</b>
<b>6- ANNEXE I .....</b>	<b>CCLIX</b>
6.1- Article 4 : Pathogenic mouse hepatitis virus or poly(I:C) induce IL-33 in hepatocytes in murine models of hepatitis .....	cclx
6.1.1- Abstract .....	cclxii
6.1.2- Introduction .....	cclxii
6.1.3- Material and Methods.....	cclxiv
6.1.4- Results .....	cclxvi
6.1.5- Discussion .....	cclxxvii
6.1.6- References .....	cclxxx

## **LISTE DES TABLEAUX**

Table I : Primer sets used for quantitative reverse transcription-PCR.....	76
Table II : Primer sets used for quantitative reverse transcription-PCR .....	118
Table III : Primer sets used for quantitative reverse transcription-PCR.....	156

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Anatomie et structures du SNC .....	6
Figure 2. Structure de la BHE et des jonctions endothéliales.....	13
Figure 3. Structure d'une portion d'un lobule hépatique et d'un sinusoïde.....	19
Figure 4. Voies de signalisation associées aux TLR.....	33
Figure 5. Organisation génomique et structurale des CoV.....	43
Figure 6. Réplication des CoV.....	46
Figure 7. Highly hepatotropic MHV3 exhibits higher tropism for LSECs than attenuated 51.6-MHV3 and YAC-MHV3. Mouse LSECs were isolated by Percoll gradient and enriched by magnetic sorting with anti-CD146 antibodies. I. LSECs were characterized by immunolabelling with antibodies for CD146, CD54, CD31 and F4/80 cell markers and cyrofluorometric analysis. II. LSECs were infected with MHV3, MHV-A59 or 51.6-MHV3 at MOI of 0.1. Cytopathic effects (CPE) were evaluated up to 72 h p.i. and were characterized by cell lysis without syncytial cells. III. Kinetics of MHV infections up to 5 days p.i. showing (A) CPE evolution, and (B) viral titers in supernatants of LSECs infected with each viral strain. All experiments were conducted in triplicate. Results are representative of two independent experiments. ***P < 0.001 when comparing MHV3 to 51.6- and YAC-MHV3. ....	80
Figure 8. Transcription levels of mRNA for IFN- $\beta$ , TLR-3, RIG-1, IRF-3 and IRF-7 and production of IFN- $\beta$ in <i>in vitro</i> MHV3-, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3-infected LSECs. LSECs were infected at 0.1 MOI of MHV3, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3. At 24, 48 or 72 h p.i., RNA of infected LSECs with each viral strain was extracted and analyzed for (A) IFN- $\beta$ , (C) TLR-3, (D) RIG-1, (E) IRF-3 and (F) IRF-7 mRNA fold changes by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to control cells after normalization with HPRT expression. All samples were run in duplicate. Protein levels of	

(B) IFN- $\beta$  were quantified by ELISA test at 48 h p.i. in supernatants from LSECs infected with each virus strain. All experiments were conducted in duplicate and results are representative of two independent experiments. \* $P$  < 0.05; \*\* $P$  < 0.01; \*\*\* $P$  < 0.001 (infected cells compared to uninfected control cells)..... 82

Figure 9. Transcription levels of mRNA for IL-10, TGF- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL1, CCL2 and CXCL10 genes and their production in *in vitro* MHV3-, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3-infected LSECs. LSECs were infected at 0.1 MOI of MHV3, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3. At 24, 48 or 72 h p.i., RNA and supernatant from LSECs infected with each viral strain were collected. I. (A) IL-10, (C) TGF- $\beta$ , (E) IL-6, and (G) TNF- $\alpha$  mRNA fold changes were analyzed by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to control LSECs after normalization with HPRT expression. All samples were run in duplicate. Production levels of (B) IL-10, (D) TGF- $\beta$ , (F) IL-6, and (H) TNF- $\alpha$  were quantified by ELISA test in supernatants from infected LSECs at 24 h p.i. II. (A) CXCL1, (C) CCL2, and (E) CXCL10 mRNA fold changes were analyzed by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice after normalization with HPRT expression. All samples were run in duplicate. Production levels of (B) CXCL1, (D) CCL2, and (F) CXCL10 were quantified by ELISA test in supernatants from infected LSECs at 24 h p.i. All experiments were conducted in duplicate and results are representative of two independent experiments. \* $P$  < 0.05; \*\* $P$  < 0.01; \*\*\* $P$  < 0.001..... 86

Figure 10. Transcription level of TLR2 in MHV3- 51.6-MHV3 and YAC-MHV3-infected LSECs and its role in viral replication and expression of IL-6 and CXCL1. A) LSECs were infected at 0.1 MOI of MHV3, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3. At 24, 48 or 72 h p.i., RNA from infected LSECs was extracted and mRNA expression levels for TLR2 gene was determined by qRT-PCR. B-D) LSECs were treated with specific siRNA to TLR2 prior to infection for 24h, and (B) MHV nucleoprotein (MHV-N), (C) IL-6, and (D)

CXCL1 mRNA expression levels were determined by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice after normalization with HPRT expression. All samples were run in duplicate and results are representative of two independent experiments.  $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$  when compared to control cells or to MHV3-infected cells. .... 87

Figure 11. Transcription levels of mRNA for Fgl2, IL-33 and caveolin-1, and production of NO and IL-33 in *in vitro* MHV3-, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3-infected LSECs. LSECs were infected at 0.1 MOI of MHV3, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3. At 24, 48 or 72 h p.i., RNA and supernatant from LSECs infected with each viral strain were collected. (A) Fgl-2, (C) caveolin-1, and (D) IL-33 mRNA fold changes were analyzed by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to control LSECs after normalization with HPRT expression. All samples were run in duplicate. (B) NO levels were quantified by the Griess reaction, and (E) production levels of IL-33 were quantified by ELISA test in supernatants from infected LSECs at 48 h p.i. All experiments were conducted in duplicate and results are representative of two independent experiments.  $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$  ..... 89

Figure 12. Hepatic damages and viral replication in highly hepatotropic MHV3- and attenuated 51.6- and YAC-MHV3-infected mice. Groups of 5 or 6 C57BL/6 were intraperitoneally infected with 1000 TCID<sub>50</sub> (tissue culture infective dose 50%) of MHV3, 51.6-MHV3 or YAC-MHV3. Serum samples from mock- and MHV3-, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3-infected mice were assayed for (A) ALT and (B) AST activities at 24, 48 and 72 h p.i. MHV3 replication in livers from each group of infected mice was determined by (C) analysis of the nucleoprotein (NP) RNA expression at 24, 48 and 72 h p.i. by RT-qPCR, and (D) by viral titration (TCID<sub>50</sub>) at 24 h and 72 h p.i. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice after normalization with HPRT expression. (E) Histopathological analysis was conducted on livers from mock- and viral-infected mice from each group at

24 and 72 h p.i. (F) Occurrence of inflammatory and hepatic necrosis foci in the liver of MHV3-, 51.6-MHV3- and YAC-MHV3-infected mice at 24, 48 and 72 h p.i.  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$  when compared to MHV3-infected mice..... 91

Figure 13. Transcription levels of mRNA for IFN- $\beta$ , TLR-3, RIG-1, IRF-3 and IRF-7 and production of IFN- $\beta$  in the liver of MHV3-, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3 infected mice. Groups of 5 or 6 C57BL/6 mice were intraperitoneally infected with 1000 TCID<sub>50</sub> (tissue culture infective dose 50%) of MHV3, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3. At 24, 48 or 72 h p.i., livers were collected from mock- and viral-infected mice from each group and (A) IFN- $\beta$ , (C) TLR-3, (D) RIG-1, (E) IRF-3 and (F) IRF-7 mRNA fold changes were analyzed by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice after normalization with HPRT expression. Samples from each mouse were run in duplicate. Protein levels of (B) IFN- $\beta$  were quantified by ELISA test at 72 h p.i. in the liver of each mouse.  $*P < 0.05$ ;  $***P < 0.001$  when compared to mock-infected mice or MHV3-infected mice..... 93

Figure 14. Transcription levels of mRNA for IL-10, TGF- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL1, CCL2 and CXCL10 genes and their production in the liver of MHV3-, 51.6-MHV3- and YAC-MHV3-infected mice. Groups of 5 or 6 C57BL/6 mice were intraperitoneally infected with 1000 TCID<sub>50</sub> (tissue culture infective dose 50%) of MHV3, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3. At 24, 48 or 72 h p.i., livers were collected from mock- and viral-infected mice of each group. Section I: (A) IL-10, (C) TGF- $\beta$ , (E) IL-6, and (G) TNF- $\alpha$  mRNA fold changes were analyzed by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice after normalization with HPRT expression. Production levels of (B) IL-10, (D) TGF- $\beta$ , (F) IL-6, and (H) TNF- $\alpha$  were quantified by ELISA test at 72 h p.i. in the liver of each mouse. Section II: (A) CXCL1, (C) CCL2, and (E) CXCL10 mRNA fold changes were analyzed by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression

relative to mock-infected mice after normalization with HPRT expression. Production levels of (B) CXCL1, (D) CCL2, and (F) CXCL10 were quantified by ELISA test at 72 h p.i. in the liver of each mouse.  $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$  when compared to mock-infected mice or MHV3-infected mice. .... 96

Figure 15. Percentages of intrahepatic mononuclear cell subsets in livers from MHV3-, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3-infected mice. Intrahepatic mononuclear cells were isolated from groups of 5 or 6 mock-infected or MHV3-, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3-infected C57BL/6 mice at 24 and 48 h p.i., immunolabelled with NK1.1, CD3, Gr1, CD11b, CD19, CD4 and CD8 monoclonal antibodies and analyzed by cytofluorometry. Percentages of (A) NKT (NK1.1+CD3+), (B) NK (NK1.1+CD3-), (C) neutrophils ( $Gr1^{hi}$  CD11b<sup>hi</sup>), (D) macrophages ( $Gr1^{+}$  CD11b<sup>int</sup>) cells, (E) (CD19+), (F) CD4 (CD3+CD4+ ) and (G) CD8 (CD3+CD8+) were evaluated in livers from each group of infected mice and compared to mock-infected mice (control).  $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$  ..... 98

Figure 16. Numbers of intrahepatic mononuclear cell subsets in livers from MHV3-, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3-infected mice. Intrahepatic mononuclear cells were isolated from groups of 5 or 6 mock-infected or MHV3-, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3-infected C57BL/6 mice at 24 and 48 h p.i., immunolabeled with NK1.1, CD3, Gr1, CD11b, CD19, CD4 and CD8 monoclonal antibodies and analyzed by cytofluorometry. Absolute numbers for each cell subset were calculated in using respective percentages reported to total number of isolated mononuclear cells in livers of respective groups. Absolute numbers of (A) NKT (NK1.1+CD3+), (B) NK (NK1.1+CD3-), (C) neutrophils ( $Gr1^{hi}$  CD11b<sup>hi</sup>), (D) macrophages ( $Gr1^{+}$  CD11b<sup>int</sup>) cells, (E) (CD19+), (F) CD4 (CD3+CD4+ ) and (G) CD8 (CD3+CD8+) were evaluated in livers from each group of infected mice and compared to mock-infected mice (control).  $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ . .... 100

Figure 17. Transcription and/or expression of Caveolin-1, Fgl2 and IL-33 in the liver of MHV3-, 51.6-MHV3- and YAC-MHV3-infected mice. Groups of 5 or 6

C57BL/6 (WT) were intraperitoneally infected with 1000 TCID<sub>50</sub> (tissue culture infective dose 50%) of MHV3, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3. At 24, 48 or 72 h.p.i., livers were collected from mock- and virally-infected mice of each group. mRNA expression for (A) caveolin -1, (C) Fgl-2, and (D) IL-33 genes was evaluated by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice after normalization with HPRT expression. (B) *In situ* expression of caveolin-1 and (F) IL-33 were determined by immunohistochemistry in livers of mock-, MHV3- and 51.6-MHV3-infected mice at 48 h p.i.. Production levels of (E) IL-33 were quantified by ELISA test at 72 h p.i. in the liver of each mouse. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001 when compared to mock-infected mice or to MHV3-infected mice. .... 102

Figure 18. Mortality, hepatic damages and viral replication during MHV3-induced hepatitis in C57BL/6 (WT) and TLR2 KO mice. I. A) Groups of 6 or 7 C57BL/6 (WT) and TLR-2 KO mice were intraperitoneally (i.p.) infected with 1000 TCID<sub>50</sub> (tissue culture infective dose 50%) of MHV3 particles. The percentages of surviving mice were recorded at various times post-infection (p.i.). B-C) Serum samples from MHV3-infected WT and TLR-2 KO were assayed for AST and ALT activity from 24 to 72 h p.i. D-E) MHV3 replication in livers of infected WT and TLR2 KO mice was determined by analysis of the nucleoprotein (MHV-N) RNA expression at 24 to 72 h p.i. by RT-qPCR, and values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice after normalization with HPRT expression. Viral titration (TCID<sub>50</sub>) in liver was done at 24 and 72 h p.i. II. Histopathological analysis was conducted on livers from mock- and MHV3-infected WT and TLR2 KO at 24, 48 and 72 h p.i. Results are representative of two different experiments. (\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001) ..... 122

Figure 19. Transcription levels of TLR-2, TLR-4, TLR-3, TLR-7 and helicases MDA-5 and RIG-1 genes in the liver of MHV3-infected WT and TLR2 KO mice. Groups of 6 or 7 C57BL/6 (WT) and TLR2 KO mice were i.p. infected with 1000 TCID<sub>50</sub> of MHV3. At 24, 48 or 72 h p.i., livers from each group were



collected and Toll-like receptors (TLR-2,-3,-4,-7) (A- D) and helicases (MDA5 and RIG-1) (E and F) mRNA fold changes were analyzed by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice (arbitrary value of 1) after normalization with HPRT expression. Results are representative of two different experiments. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  when compared with respective mock-infected mice or TLR2 KO compared to WT mice. N.D.: not done..... 124

Figure 20. mRNA levels and production of IFN- $\beta$  and inflammatory cytokines in the liver of MHV3-infected WT and TLR2 KO mice. Groups of 6 or 7 C57BL/6 (WT) and TLR2 KO mice were i.p. infected with 1000 TCID<sub>50</sub> of MHV3. At 24, 48 or 72 h p.i., livers from each group were collected. mRNA fold increases for IFN- $\beta$  (A) IL-6 (C) and TNF- $\alpha$  (E) were evaluated by qRT-PCR in livers of MHV3-infected WT and TLR2 KO mice. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice (arbitrary value of 1) after normalization with HPRT expression. Production levels of IFN- $\beta$  (B) IL-6 (D) and TNF- $\alpha$  (F) were quantified by ELISA test at 72 h p.i. in livers. Results are representative of two different experiments. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  when compared with respective mock-infected mice or TLR2 KO compared to WT mice (underlined)). ..... 126

Figure 21. mRNA level and production of IL-33 or fibrinogen-like 2 (Fgl2) gene in the liver of MHV3-infected WT and TLR2 KO mice. Groups of 6 or 7 C57BL/6 (WT) and TLR2 KO mice were i.p. infected with 1000 TCID<sub>50</sub> of MHV3. At 24, 48 or 72 h p.i., livers from each group were collected. I- mRNA expression for IL-33 (A) and Fgl2 (B) genes was evaluated by qRT-PCR in livers of MHV3-infected WT and TLR2 KO mice. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice (arbitrary value of 1) after normalization with HPRT expression. II- Expression of IL-33 determined by immunohistochemistry in livers of mock-infected (A) and MHV3-infected WT mice at 24, 48 and 72 h p.i.(B to D). Representative of 6 mice by groups. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  when compared with

respective mock-infected mice or TLR2 KO compared to WT mice (underlined)). ..... 128

Figure 22. Expression levels of CCL2, CXCL1 and CXCL10 in the liver of MHV3-infected WT and TLR2 KO mice. Groups of 6 or 7 C57BL/6 (WT) and TLR2 KO mice were i.p. infected with 1000 TCID<sub>50</sub> of MHV3. At 24, 48 or 72 h p.i., livers from each group were collected. I. mRNA expression for CXCL1 (A), CCL2 (C) and CXCL10 (E) genes was evaluated by qRT-PCR in livers from MHV3-infected WT and TLR2 KO mice. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice (arbitrary value of 1) after normalization with HPRT expression. Protein levels of CXCL1 (D), CCL2 (E) and CXCL10 (F) in the liver were quantified by ELISA test at 72 h p.i. II. Expression of CXCL10, determined by immunohistochemistry, in livers of MHV3-infected WT (A) and MHV3-infected TLR2 KO (B) mice. Representative of 6 mice by groups. (\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001 when compared with respective mock-infected mice or TLR2KO compared to WT mice (underlined)). ..... 130

Figure 23. Analysis of intrahepatic mononuclear cells in livers of MHV3-infected WT and TLR2 KO mice. Intrahepatic mononuclear cells were isolated from groups of 6 mock-infected or MHV3-infected C57BL/6 and TLR2 KO mice at 24 and 48 h p.i., immunolabelled with NK1.1, CD3, Gr1, CD11b, CD19, CD4 and CD8 monoclonal antibodies and analyzed by cytofluorometry. A-D) Percentages of NK-T (NK1.1+CD3+), NK (NK1.1+CD3-), neutrophils (Gr1<sup>hi</sup> CD11b<sup>hi</sup>) and macrophages (Gr1<sup>+</sup> CD11b<sup>int</sup>) cells were evaluated in livers from mock- and MHV3-infected WT (A) and TLR2 KO (C) mice. Percentages of B (CD19+), and CD4 (CD3+CD4+) and CD8 (CD3+CD8+) subpopulations of CD3+ NK1.1 cells were similarly analyzed (B and D). E-H) Absolute numbers for each cell subset were calculated in using respective percentages reported to total number of isolated mononuclear cells in livers of mock- and MHV3-infected WT and TLR2 KO mice (\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001). ..... 133

Figure 24. Hepatic damages, viral replication and IFN- $\beta$  production in the liver of C57BL/6 mice infected with the lower hepatotropic and TLR2-independent MHV-A59 strain. Groups of 6 to 7 C57BL/6 mice were i.p. infected with 1000 TCID<sub>50</sub> of MHV-A59 or MHV3. I- Histopathological analysis was conducted on livers from MHV-A59-infected mice at 24, 48 and 72 h p.i. (A to C). Extensive necrotic foci in MHV3-infected mice (D) compared with lower necrotic foci surrounded by inflammatory cells in liver from MHV-A59-infected mice (E). II- Serum samples from MHV3- and MHV-A59-infected mice were assayed for AST (A) and ALT (B) activity at 24 to 72 h p.i. C-D) Replication of MHV-A59 and MHV3 in livers of infected mice was determined by analysis of the nucleoprotein (MHV-N) RNA expression at 24, 48 and 72 h p.i. by RT-qPCR, and by viral titration (TCID<sub>50</sub>) at 24 and 72 h p.i.. E) mRNA fold increases for IFN- $\beta$  were analyzed in livers from MHV3- and MHV-A59-infected mice by qRT-PCR at 24, 48 and 72 h p.i. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice (arbitrary value of 1) after normalization with HPRT expression. F) Protein levels of IFN- $\beta$  in the liver were quantified by ELISA test at 72 h p.i. (\* $P$  < 0.05; \*\* $P$  < 0.01; \*\*\* $P$  < 0.001 when MHV-A59 is compared to MHV3)..... 135

Figure 25. mRNA levels of TLR-2, -4, -3, -7 and helicases MDA-5 and RIG-1 genes in the liver of MHV-A59-infected C57BL/6 mice. Groups of 6 or 7 C57BL/6 mice were i.p. infected with 1000 TCID<sub>50</sub> of MHV-A59. At 24, 48 or 72 h p.i., livers from each group were collected and Toll-like receptors (TLR-2, -3, -4, -7) and helicases (MDA5 and RIG-1) mRNA fold changes were analyzed by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice (arbitrary value of 1) after normalization with HPRT expression. (\* $P$  < 0.05; \*\* $P$  < 0.01; \*\*\* $P$  < 0.001 when compared with mock-infected mice). ..... 136

Figure 26. Inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$ , alarmin IL-33, Fgl2, and chemokines CCL2, CXCL1 and CXCL10 higher decrease in the liver of

MHV-A59-infected mice compared to MHV3-infected mice. Groups of 6 or 7 C57BL/6 mice were i.p. infected with 1000 TCID<sub>50</sub> of MHV3 or MHV-A59. At 24, 48 or 72 h p.i., livers from each group were collected. A-D) mRNA fold increases for IL-6 and TNF- $\alpha$  genes (A and C) evaluated by qRT-PCR at 24, 48 and 72 h p.i., and cytokines levels (B and D), quantified by ELISA tests at 72 h p.i., were compared in livers from MHV3- and MHV-A59-infected mice E-F) mRNA expression levels for IL-33 (E) and Fgl2 (F) were evaluated by qRT-PCR at 24, 48 and 72 h p.i in livers from MHV3- or MHV-A59-infected mice. G-L). mRNA expression levels for CCL2 (G), CXCL1 (I) and CXCL10 (K) were evaluated by qRT-PCR at 24, 48 and 72 h p.i in livers from MHV3- or MHV-A59-infected mice. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice (arbitrary value of 1) after normalization with HPRT expression. Protein levels of CCL2 (H), CXCL1 (J) and CXCL10 (L) were quantified in livers by ELISA test at 72 h p.i. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  when compared with respective mock-infected mice or MHV-A59- compared to MHV3-infected mice (underlined)). ..... 139

Figure 27. Analysis of intrahepatic mononuclear cells in the liver of MHV-A59-infected C57BL/6 mice. Intrahepatic mononuclear cells were isolated from groups of 6 mock-infected and MHV-A59-infected C57BL/6 mice at 24 and 48 h p.i., immunolabelled with NK1.1, CD3, Gr1, CD11b, CD19, CD4 and CD8 monoclonal antibodies and analyzed by cytofluorometry. A) Percentages of NK-T (NK1.1+CD3+), NK (NK1.1+CD3-), neutrophils (Gr1<sup>hi</sup> CD11b<sup>hi</sup>) and macrophages (Gr1<sup>+</sup> CD11b<sup>int</sup>) cells were evaluated in the liver of infected mice. B) Percentages of B (CD19+), and CD4 (CD3+CD4+) and CD8 (CD3+CD8+) subpopulations of CD3+ NK1.1 cells were similarly analyzed. C-D) Absolute numbers for each cell subset were calculated in using respective percentages reported to total number of isolated mononuclear cells in the liver (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  when compared with respective mock-infected mice). ..... 140

- Figure 28. Brain invasion by hematogenous spread MHVs correlates with virulence. A) Groups of 6-7 mice were i.p. mock-infected (PBS) or infected with 1000 TCID<sub>50</sub> (tissue culture infective dose 50 %) of MHV3, MHV-A59 and 51.6-MHV3 for 72 h and harvested brains were subjected to hematoxylin-eosin-safranin staining for histopathological analyses; B-C) Viral detection of MHV3, MHV-A59 and 51.6-MHV3 at 72h p.i. in brain samples of infected mice determined by qRT-PCR analysis of the viral nucleoprotein (N) expression and viral titration (TCID<sub>50</sub>). Viral detection threshold is 1.6 TCID<sub>50</sub>/ml (\*\**P* < 0.001) ..... 161
- Figure 29. MHV3, but not MHV-A59 and 51.6-MHV3, induces BBB breakdown. Groups of 6-7 mice were i.p. mock-infected (PBS) or infected with 1000 TCID<sub>50</sub> of MHV3, MHV-A59 and 51.6-MHV3 for 72 h. A) Determination of BBB permeability assessed by sodium fluorescein (NaF) uptake 1 h prior to euthanasia. B-E) mRNA expression of occludin (B), ZO-1 (C), VE-cadherin (D) and claudin-5 (E) was evaluated in brain samples by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice after normalization with HPRT expression. All samples were run in duplicate. F) Immunohistochemistry stainings of VE-cadherin, occludin and ZO-1 on brain sections of MHV3-, MHV-A59- and 51.6-MHV3-infected mice. (\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001)..... 163
- Figure 30. MHV3 exhibits higher tropism for BMECs than MHV-A59 and 51.6-MHV3. Mouse bEnd.3 immortalized brain microvascular endothelial cells (BMECs) were infected with MHV3, MHV-A59 or 51.6-MHV3 at M.O.I of 0.1 A) Kinetics of MHV infections up to 8 days p.i. B) Metabolic activity of infected BMECs as determined by MTS-PMS colorimetric assay from 24 h to 72 h p.i. C) Role of CEACAM1a and TLR2 in MHV entry into BMECs, and D) Role of caveolin (CAV-1) and clathrin (CLT) in MHV endocytosis by BMECs. bEnd.3 cells were treated with specific siRNA to each molecule prior to infection for 24h and MHV nucleoprotein (N) mRNA expression was determined by qRT-PCR. All experiments were conducted in triplicate.

Results are representative of two or three independent experiments. (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001)..... 166

Figure 31. MHV3, but not MHV-A59 and 51.6-MHV3, alters *in vitro* BMEC barrier integrity. An *in vitro* model of BBB was constructed using bEnd.3 cell monolayers grown on transwell inserts and cells were infected with MHV3, MHV-A59 or 51.6-MHV3 at M.O.I of 0.1. A) Transendothelial electrical resistance (TEER), reflecting barrier integrity, was monitored from 24 to 72 h. B-C) Evaluation of the paracellular permeability of bEnd.3 monolayers to NaF (B) or Evans blue (C) dye at 24 and 48 h p.i. Blank corresponds to maximal permeability (insert without cells) D) Determination of viral transmigration across the bEnd.3 monolayer. Viral titers were recorded in the basolateral chamber from 24 to 72 h p.i. Viral detection threshold is 1.6 TCID<sub>50</sub>. All experiments were conducted in triplicate. Results are representative of two independent experiments. (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01). 168

Figure 32. MHV3, but not MHV-A59 and 51.6-MHV3, alters tight junction expression on BMECs. bEnd.3 cells were infected for 48h with MHV3, MHV-A59 and 51.6-MHV3 at M.O.I of 0.1 and mRNA expression levels of occludin (A), VE-cadherin (B), ZO-1 (C) and claudin-5 (D) were evaluated by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to uninfected cells (CTRL) after normalization with HPRT expression. All samples were run in duplicate. All experiments were conducted in triplicate. Results are representative of two independent experiments. E) Immunofluorescence stainings of the tight junctions (green) VE-cadherin, occludin, ZO-1 and the nucleus (blue) on uninfected (CTRL) and infected bEnd.3 cells. Images presented are from one representative experiment out of 3 independent experiments. (\*P < 0.05)..... 169

Figure 33. MHV3-induced breakdown of BMEC barrier does not depend on inflammatory factors. bEnd.3 cells were infected with MHV3, MHV-A59 and 51.6-MHV3 at M.O.I of 0.1 and mRNA expression (A-C-E-G) and protein levels (B-D-F-H) of TNF- $\alpha$ , IL-6, CCL2 and CXCL10 were evaluated by qRT-PCR and ELISA tests respectively at 24h p.i. All samples

were run in duplicate. All experiments were conducted in triplicate. Results are representative of two independent experiments. (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001) ..... 171

Figure 34. MHV3-induced breakdown of BMEC barrier is related to downregulation of barrier protective IFN- $\beta$  production by infected BMECs. A-B) bEnd.3 cells were infected with MHV3, MHV-A59 and 51.6-MHV3 at M.O.I of 0.1 and mRNA (A) and protein expression (B) of IFN- $\beta$  was evaluated at 24h p.i. by qRT-PCR and ELISA tests respectively. All samples were run in duplicate. All experiments were conducted in triplicate. C-H) Evaluation of barrier integrity of bEnd.3 monolayers infected 48 h with MHV3, MHV-A59 and 51.6-MHV3 at M.O.I of 0.1 in presence of recombinant IFN- $\beta$  (100 pg/ml) or anti-IFN- $\beta$  monoclonal antibodies (1 ug/ml). C) Recordings of TEER in infected bEnd.3 cultures. D-E) Evaluation of the paracellular permeability of infected bEnd.3 monolayers to NaF (D) or Evans blue (E) dyes. F-H) mRNA expression levels of occludin, ZO-1 and VE-cadherin in bEnd.3 cells evaluated by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to uninfected cells (CTRL) after normalization with HPRT expression. Results are representative of two independent experiments. (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001)..... 174

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC	: Cassette liant l'ATP (ATP-binding cassette)
ACE2	: Enzyme de conversion de l'angiotensine-2 (angiotensin-2 conversion enzyme)
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ALT	: Alanine aminotransférase
ANOVA	: Analyse de variance (Analysis of variance)
AP-1	: Protéine activatrice 1 (activator protein 1)
APC	: Allophycocyanine
APC-Cy7	: APC- cyanine 7
ARN	: Acide ribonucléique
ARNdb	: Acide ribonucléique double brin
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
ARNsb	: Acide ribonucléique simple brin
AST	: Aspartate aminotransférase
ATCC	: American type culture collection
BBB	: Blood brain barrier
BCR	: Récepteur des cellules B (B cell receptor)
BMEC	: Cellule endothéliale des microvaisseaux cérébraux (brain microvascular endothelial cell)
BMP4	: Protéine morphogénétique osseuse 4 (bone morphogenetic protein 4)
BSA	: Albumine bovine sérique (Bovine serum albumin)
BHE	: Barrière hémato-encéphalique
°C	: Degré Celsius
CARD	: Domaine recrutant les caspases (caspase recruiting domain)
CAV-1	: Cavéoline-1
CCL	: Chimiochine possédant des motifs C-C (chemokine (C-C motif) ligand)
CD	: Marqueur de différenciation (Cluster of differentiation)
cDNA	: ADN complémentaire (complementary DNA)



CEACAM	: Molécule d'adhésion cellulaire de l'antigène carcino-embryonnaire (« Carcino-embryonic antigen cell adhesion molecule »)
CHC	: Carcinome hépatocellulaire
CIPA	: Comité institutionnel de protection des animaux
CLT	: Clathrine
cm	: Centimètre
CMH-I/II	: Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I / II
CNS	: Central nervous system
ConA	: Concanavaline A
CoV	: Coronavirus
CPA	: Cellule présentatrice d'antigènes
CPE	: Effet cytopathique (Cytopathic effect)
CREB	: Protéine se fixant au C-AMP (C-AMP Response Element-binding protein)
CRP	: Protéine C-réactive (c-reactive protein)
Ct	: Valeur de cycle limite (threshold cycle value)
CTRL	: Contrôle
CXCL	: Chimiochine possédant des motifs C-X-C (Chemokine (C-X-C motif) ligand)
DAMP	: Motif moléculaire associé aux dommages (damage associated molecular pattern)
DAPI	: 4',6'-diamidino-2-phénylindole
DC	: Cellule dendritique (dendritic cell)
DC-SIGN	: Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-Integrin
DNA	: Desoxyribonucleic acid
DPP4	: Dipeptidyl peptidase-4
EC	: Cellule endothéliale
ELISA	: Test d'immunoabsorbance lié à une enzyme (Enzyme linked immunosorbent assay)
ER	: Réticulum endoplasmique (endoplasmic reticulum)
ERGIC	: Compartiments intermédiaires ER-Golgi (ER-Golgi intermediate compartments)
EVB	: Bleu d'Evans (Evans blue)

FasL	: Fas ligand
Fc	: Fragment cristallisable des immunoglobulines
FCS	: S�rum de veau foetal (Fetal calf serum)
fgl-2	: Protéine fibrinog�ne-«like» 2 (Fibrinogen-like protein 2)
FITC	: Fluorescéine isothiocyanate
g	: Gramme
GLUT	: Transporteur de glucose (glucose transporter)
gp120	: Glycoprotéine 120
GTPase	: Enzyme hydrolysant le guanosine triphosphate
h :	: Heure
HA	: Hémagglutinine du virus influenza
HAV	: Virus de l'hépatite A (Hepatitis A virus)
HBV	: Virus de l'hépatite B (Hepatitis B virus)
HCV	: Virus de l'hépatite C (Hepatitis C virus)
HCoV	: Coronavirus humain (Human coronavirus)
HDV	: Virus de l'hépatite D (Hepatitis D virus)
HE	: Hémagglutinine estérase ou Hematoxyline �osine
HEPA	: Filtre � particules aériennes de haute efficacité (high efficiency particulate air filter)
HEV	: Entérovirus humains (Human enterovirus)
HIV	: Virus de l'immunodéficiency humaine (Human immunodeficiency virus)
HMGB1	: High-mobility group box-1 protein
HPRT	: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransf�rase
HRP	: Horseradish peroxidase
HSC	: Cellule stellaire hépatique (hepatic stellar cell)
HSP	: Protéine de choc thermique (Heat Shock Protein)
HSPG	: H�parane sulfate prot�oglycane
HSV	: Virus Herp�s Simplex
IBV	: Virus de la bronchite infectieuse (Infectious bronchitis virus)
ICAM	: Molécule d'adhésion intercellulaire (Intercellular adhesion molecule)
IFCC	: International Federation of Clinical Chemistry

IFIT2	: IFN-induced proteins with tetratricopeptide repeats type 2
IFN	: Interféron
Ig	: Immunoglobuline
IKK	: Kinase de l'inhibiteur de NF- $\kappa$ B
IL	: Interleukine
i.p.	: Intra-péritonéal
IRAK	: Kinase associée au récepteur de l'IL-1 (IL-1R-associated kinase)
IRF	: Facteur de régulation de l'interféron (Interferon regulatory factor)
i.v.	: Intra-veineux
JEV	: Virus de l'encéphalite japonaise (Japanese encephalitis virus)
JNK	: Kinase c-Jun N-terminale (c-Jun N-terminal kinase)
KC	: Cellule de Kupffer (Kupffer cell)
kDa	: Kilodalton
KO	: Knock-out
LAT	: Transporteur d'acides aminées de type L (L-type amino acid transporter)
LCMV	: Virus de la chorioméningite lymphocytaire (Lymphocytic choriomeningitis virus)
LCR	: Liquide céphalo-rachidien
LPS	: Lipopolysaccharide
LSEC	: Cellule endothéliale sinusoidale hépatique (Liver sinusoidal endothelial cell)
M	: Molaire
MAL	: Adaptateur ressemblant à MyD88 (MyD88 adapter-like)
MAPK	: Protéine kinase activée par des mitogènes (Mitogen-activated protein kinase)
MAV	: Adénovirus murin (mouse adenovirus)
MBL	: Lectine liant le mannose (mannose binding lectin)
MCMV	: Cytomégalovirus murin (Murine cytomegalovirus)
MCP-1	: Protéine chimiotactique des macrophages-1 (Macrophage chemoattractant protein-1)
MDA-5	: Melanoma differentiation-associated protein 5
MERS	: Syndrome respiratoire du Moyen-Orient (Middle East respiratory syndrome)
MHV	: Virus d'hépatite murine

min	: Minute
MIP	: Protéine inflammatoire macrophagique (macrophage inflammatory protein)
ml	: Millilitre
mm	: Millimètre
MMP	: Métalloprotéase matricielle (matrix metalloproteinase)
m.o.i.	: Multiplicité d'infection (Multiplicity of infection)
mRNA	: Messenger RNA
MRP	: Protéine de résistance multiple (multi-resistance protein)
MSRV	: multiple sclerosis-associated retrovirus
MTS/PMS	: 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H- tétrazolium / phénazine méthosulfate
MW	: Poids moléculaire (molecular weight)
MyD88	: Facteur de différenciation myéloïde 88 (Myeloid differentiation factor 88)
NaF	: Sodium Fluorescein
NCAM	: Molécule d'adhésion cellulaire neuronale (neural cell adhesion molecule)
NET	: Neutrophil extracellular traps
NF- $\kappa$ B	: Facteur nucléaire kappa B (Nuclear factor-kappa B)
ng	: Nanogramme
NK	: Cellule tueuse naturelle (Natural killer cell)
NK-T	: Cellule tueuse naturelle possédant un TCR
nm	: Nanomètre
NO	: Oxyde nitrique
NOS	: NO synthase
NPC	: Cellule non parenchymateuse (non parenchymal cell)
NSERC	: Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (Natural sciences and engineering research council of Canada)
nsp	: protéine non structurale (non-structural protein)
O.D.	: Densité optique (optical density)
ORF	: Séquence à cadre de lecture ouvert (Open reading frame)
PAMP	: Motif moléculaire associé aux pathogènes (« Pathogen associated molecular pattern »)

PAF	: Paraformaldéhyde
PBMC	: Cellule mononuclée du sang périphérique (Peripheral blood mononuclear cell)
PBS	: Tampon phosphate salin (phosphate buffered saline)
PCR	: Réaction en chaîne par la polymérase (polymerase chain reaction)
PD-L1	: Ligand de mort programmée 1 (Programmed death-ligand 1)
PE	: Phycoérythrine
PECAM	: Molécule d'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales (Platelet-endothelial cell adhesion molecule)
PE-Cy7	: PE- cyanine 7
PerCP-Cy5.5	: Peridinine Chlorophylle Protéine- cyanine 5.5
pg	: Picogramme
PGE <sub>2</sub>	: Prostaglandine E <sub>2</sub>
pH	: Potentiel d'hydrogène
PHA	: Phytohémagglutinine
p.i.	: Post-infection
Poly(I:C)	: Acide polyinosinique-polycytidylique
PRR	: Récepteur de reconnaissance de motifs (Pattern recognition receptor)
PSG16	: Glycoprotéine spécifique de la grossesse 16 (pregnancy-specific glycoprotein 16)
qPCR	: PCR quantitatif (quantitative PCR)
qRT-PCR	: PCR quantitatif en temps réel (quantitative real-time PCR)
RNA	: Ribonucleic acid
RIG-I	: Retinoic acid-inducible gene 1
RIP1	: Receptor-interacting protein 1
ROS	: Espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species)
RPM	: Rotation par minute
RT	: Température pièce (room temperature)
SARS	: Syndrome respiratoire aiguë sévère (Severe acute respiratory syndrome)
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
SIDA	: Syndrome de l'immunodéficience acquise
siRNA	: Petits ARN interférents (Small interfering RNA)

SNC	: Système nerveux central
SR	: Récepteur éboueur (scavenger receptor)
SRAM	: <i>Sarcophaga</i> -derived Rel/Ankyrin molecule
STAT	: Signal de transduction et d'activation de la transcription (Signal transducer and activator of transcription)
TAB	: Protéine se liant à la kinase activée par le TGF- $\beta$ (TGF- $\beta$ -activated kinase Binding Protein)
TAK	: Kinase activée par le TGF- $\beta$ (TGF- $\beta$ -activated kinase)
Tat	: Trans-activating
TBK	: Kinase se liant à Tank (Tank-binding kinase)
TCID	: Dose infectieuse dans une culture de tissu (Tissue culture infectious dose)
TCR	: Récepteur des cellules T (T cell receptor)
TEER	: Résistance électrique transendothéliale (transendothelial electrical resistance)
TGEV	: Transmissible gastroenteritis coronavirus
TGF- $\beta$	: Facteur de croissance transformant $\beta$ (Tumor growth factor)
Th	: Cellule T auxiliaire (T helper cell)
TIR	: domaine associé aux récepteurs Toll et IL-1 (Toll/IL-1 receptor)
TIRAP	: Protéine adaptatrice possédant des domaines Toll/IL-1R (Toll/IL-1R domain-containing adaptor protein)
TLR	: Récepteur toll (Toll like receptor)
TNF	: Facteur de nécrose tumorale (Tumor necrosis factor)
TNFR1	: Récepteur du TNF-1
TRAF	: Facteur associé au récepteur du TNF (TNF receptor-associated factor)
TRAIL	: Tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand
TRAM	: Molécule adaptatrice associée à TRIF (TRIF-related adaptor molecule)
Treg	: Cellule T régulatrice
TRIF	: Adaptateur induisant l'interferon- $\beta$ et contenant un domaine TIR (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ )
U	: Unité
$\mu\text{g}$	: Microgramme

$\mu\text{l}$	: Microlitre
$\mu\text{m}$	: Micromètre
UTR	: Région non traduite (Untranslated region)
VCAM	: Molécule d'adhésion des cellules vasculaires (Vascular cell adhesion molecule)
VE-cadh	: Vascular endothelial cadherin
VEGF	: Vascular endothelial growth factor
VIH	: Virus de l'immunodéficience humaine
Vol	: Volume
WNV	: West nile virus
WT	: Wild type
ZO-1	: <i>Zona occludens-1</i>

## REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord infiniment remercier ma directrice de recherche, Dre Lucie Lamontagne, pour m'avoir si généreusement encadré et appuyé tout au long de ce projet doctoral. D'abord à titre d'assistant de recherche puis ensuite comme étudiant au doctorat, j'ai eu l'opportunité d'évoluer dans un climat où le dialogue, la confiance et la rigueur étaient omniprésents. Elle a fortement contribué au développement de mon autonomie et à parfaire ma réflexion scientifique, mes aptitudes analytiques et mon sens critique. En m'initiant à la gestion courante du laboratoire et en me donnant l'occasion d'enseigner, de superviser plusieurs stagiaires et de participer à différents projets de recherche simultanément, j'ai pu élargir mes champs de compétences, consolider et maximiser mes aptitudes en recherche et acquérir des habiletés pour le leadership, la gestion et la pédagogie. Ces atouts inestimables seront profitables à ma future carrière comme chercheur et professeur. Enfin, merci pour m'avoir donné le privilège de présenter mes travaux dans des congrès de calibre international et d'acquérir une solide expertise avec des technologies de pointe dans le cadre de stages à l'étranger.

Je remercie les Drs. Michel Samson et Claire Picquet-Pellorce de m'avoir généreusement accueilli dans leur laboratoire à Rennes. Leur passion contagieuse pour la recherche, leurs judicieux conseils et leurs expertises technique et scientifique ont contribué à valoriser ce projet. Je tiens également à remercier Mélanie Burnette pour son aide technique dans les moments où deux personnes étaient requises et qui, par sa bonne humeur, a contribué à rendre l'atmosphère du laboratoire plus qu'agréable. Merci à tous ceux et celles que j'ai côtoyés durant mes études, particulièrement les étudiant(e)s du laboratoire et les techniciens du département.

Merci aussi à mes parents qui m'ont encouragé tout au long du parcours et dont l'appui financier inconditionnel dans les moments plus critiques fut d'un support inestimable.

Finalement, un merci tout spécial à mon amour, Jessica, pour ses encouragements, son expertise avec les logiciels, son soutien moral dans les moments plus difficiles, mais avant tout, pour sa sérénité apaisante et sa capacité à m'élever vers des sommets personnels.



# **1- INTRODUCTION**

Les rôles des cellules endothéliales (EC) dans la réponse immune innée lors d'infections virales dans des organes immunoprivilégiés, tel le cerveau, ou immunotolérants, tel le foie ne sont que partiellement élucidés. Néanmoins, des atteintes au niveau de l'intégrité structurale et fonctionnelle des EC de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et des EC des sinusoides hépatiques semblent reliées à la pathogénèse de plusieurs maladies inflammatoires d'origine infectieuse ou non telles que la sclérose en plaques et l'hépatite aiguë ou chronique. Les EC, par leur position anatomique, représentent une première barrière à l'invasion virale par voie hématogène du foie et du cerveau et pourraient constituer une première ligne de défense antivirale par leur capacité à produire des cytokines et des chimiokines et à favoriser le recrutement de cellules inflammatoires. Cependant, le rôle de ces cellules dans le contrôle antiviral précoce est peu connu et des effets protecteurs ou au contraire aggravants ont été rapportés dans différentes pathologies d'origine virale. Ces rôles opposés pourraient refléter l'hétérogénéité et la spécialisation fonctionnelle des EC selon leur origine tissulaire et la virulence et le tropisme des agents viraux en cause. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à identifier les mécanismes impliqués dans les déficits structuraux et fonctionnels des EC cérébrales et des sinusoides hépatiques et leur conséquence sur la pathogénèse lors d'infections virales aiguës à l'aide du modèle d'infection par les coronavirus de l'hépatite murine (MHV), pour leur tropisme envers les EC et leur capacité à induire des hépatites et des maladies neurologiques.

La revue de littérature sera orientée vers l'anatomie du SNC et la structure fonctionnelle du foie, ciblant plus précisément la structure et la fonction des EC cérébrales (BMEC) et des EC des sinusoides hépatiques (LSEC) et présentera les fondements théoriques sur lesquels s'appuie ce projet doctoral. La contribution des EC dans l'immunité innée antivirale, avec une emphase sur le rôle des TLR comme senseurs viraux, ainsi que les atteintes structurales et fonctionnelles induites lors d'infections virales seront détaillées. Enfin, les caractéristiques générales des coronavirus et plus spécifiquement des sérotypes MHV utilisés dans cette étude de même que les neuropathologies et les hépatites qu'ils causent seront présentées. Fort de ces informations, les objectifs et hypothèses de recherche seront formulés puis validés sous la forme de trois articles dans la section résultats.

Au cours de cette thèse, il sera démontré pour la première fois l'importance des anomalies fonctionnelles et structurales des EC cérébrales et hépatiques dans l'invasion virale intracérébrale et la sévérité de l'hépatite induite lors d'infections par voie hématogène. Plus précisément, nous démontrerons que le sérotype fortement pathogène MHV3 provoque le bris de la barrière hémato-encéphalique en perturbant l'expression des protéines de jonctions des EC cérébrales facilitant son entrée dans le SNC. D'autre part, il sera démontré que l'infection par le MHV3 entraîne également un bris fonctionnel de la tolérance hépatique médiée par les EC sinusoidales. Par ailleurs, l'importance de la production d'IFN- $\beta$  par les EC cérébrales et hépatiques dans la prévention de l'invasion virale du système nerveux central (SNC) et le contrôle précoce de l'infection virale dans le foie sera mise en évidence. Nous démontrerons également que la sévérité de l'hépatite induite par le MHV3 est associée en partie à une exacerbation de la réponse pro-inflammatoire (cytokines, chimiokines) consécutive à l'induction virale et l'activation du TLR2 dans le foie. L'importance de la virulence et du tropisme des MHV pour les EC cérébrales et hépatiques dans la pathogenèse sera démontrée à l'aide de plusieurs sérotypes de MHV et des virus variants du MHV3 présentant différents niveaux de pathogénicité et/ou de tropisme pour les EC.

Enfin, une discussion générale établissant les liens entre les résultats présentés dans les différents articles ainsi que leurs contributions dans la compréhension des infections hépatiques et neurologiques humaines terminera cette thèse.

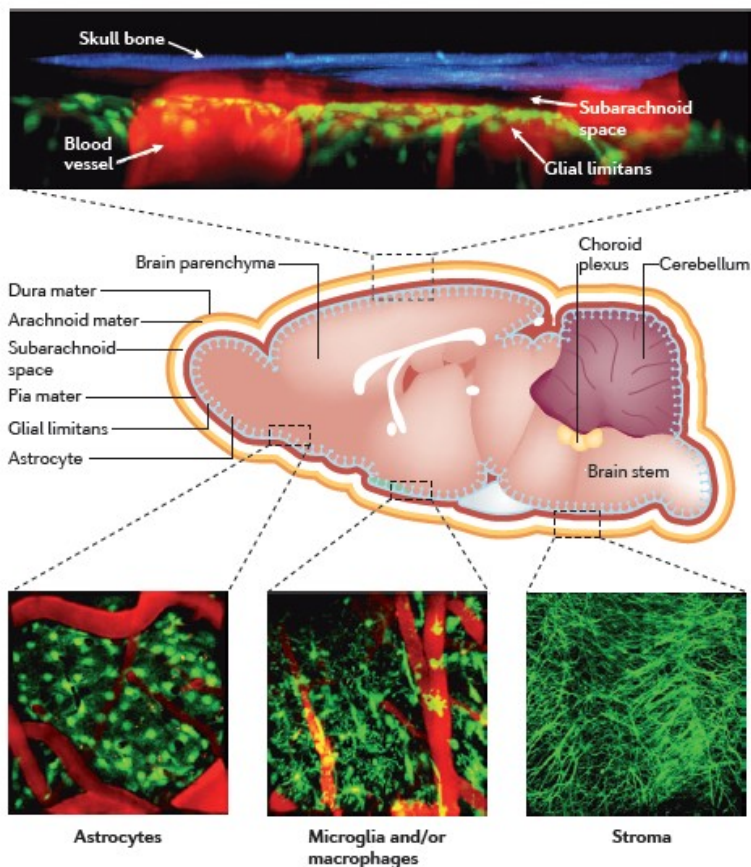
## **2- REVUE DE LA LITTÉRATURE**

## **2.1- Les infections virales neurologiques**

### **2.1.1- Structure du système nerveux central**

Le système nerveux central (SNC) comprend l'encéphale et la moelle épinière, respectivement protégés par la boîte crânienne et la colonne vertébrale, dans lesquels se situent des tissus nerveux, composés de neurones et de cellules gliales et vasculaires. La surface externe du SNC est enveloppée par trois membranes, les méninges, qui font office de protection. La plus externe de ces membranes, la dure-mère, recouvre l'arachnoïde et la pie-mère entre lesquelles circule, dans l'espace subarachnoïde, le liquide céphalo-rachidien (LCR) qui assure une protection mécanique contre les chocs et le transport des nutriments et des déchets dans le SNC (Fig. 1) (Jiménez *et al.*, 2014). L'espace subarachnoïde contient aussi des macrophages, des cellules stromales et des vaisseaux sanguins qui traversent les méninges pour irriguer le parenchyme cérébral. Sous la pie-mère repose la *glia limitans*, un film protecteur formé de la lamina basale et de prolongements astrocytaires qui isolent les méninges du parenchyme cérébral sous-jacent, lequel contient les neurones et les cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes et microglie) (McGavern & Kang, 2011). Les neurones assurent la transmission des influx nerveux alors que les cellules gliales, dix fois plus nombreuses, exercent des fonctions de soutien (Temburni & Jacob, 2001). Le maintien de l'homéostasie dans le SNC est primordial pour la protection des neurones post-mitotiques et est assuré par un système de barrières vasculaires qui contrôlent les échanges sang-cerveau et isolent le fragile parenchyme cérébral du système immunitaire systémique, des agents pathogènes et de leurs toxines. La plus importante de ces barrières est la barrière hémato-encéphalique (BHE), assurée par les cellules endothéliales non-fenestrées et munies de jonctions serrées qui bordent la majorité des vaisseaux sanguins irriguant le SNC (revue dans Daniels & Klein, 2015). Une deuxième barrière sang-LCR, est localisée spécifiquement au niveau des plexus choroïdiens et est assurée par les jonctions serrées des cellules épendymales des 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> ventricules. Ces cellules forment, avec les vaisseaux sanguins fenestrés des plexus choroïdiens, des interfaces fonctionnelles servant à élaborer le LCR à partir des éléments sanguins (Czosnyka *et al.* 2004). En régulant finement la composition du LCR par un pompage actif de certains ions,

particulièrement les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ , les cellules épendymales établissent une concentration ionique dans le LCR compatible avec l'émission des influx nerveux (Jiménez *et al.*, 2014).



### Figure 1. Anatomie et structures du SNC

Le revêtement extérieur du cerveau est protégé par les méninges soit la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère. Le liquide céphalo-rachidien circule entre l'arachnoïde et la pie-mère à travers l'espace sous-arachnoïdien. Les méninges sont considérés comme faisant partie de la barrière hémato-encéphalique. La *glia limitans* située sous la pie-mère sépare les méninges du parenchyme cérébral qui contient les neurones, les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules microgliales (McGavern & Kang, 2011).

#### 2.1.2- Neuropathologies causées par des infections virales du SNC

Bien qu'il soit protégé par un système de barrières hautement sophistiquées, le SNC peut néanmoins être le siège d'infections par plusieurs types de microorganismes pathogènes. Les infections virales du SNC sont cependant les plus fréquentes, affectant plus d'un demi-million

d'individus chaque année, un nombre plus important que les infections bactériennes, fongiques, et protozoaires combinées (Romero & Newland, 2003). De fait, des membres d'au moins 11 familles de virus incluant des virus à génome ADN, des rétrovirus et des virus à génome ARN ont adopté des stratégies de contournement des barrières du SNC et peuvent être responsables de divers types de neuropathologies (Knipe & Howley, 2007). Selon le site d'introduction et le tropisme viral dans le SNC, l'infection peut entraîner une inflammation circonscrite à des régions anatomiques précises, telles que les méninges (méningite), le parenchyme de l'encéphale (encéphalite) ou de la moelle épinière (myélite), ou s'étendre à plusieurs régions simultanément (méningoencéphalite, encéphalomyélite) (revue dans Swanson & McGavern, 2015).

La vaste majorité des méningites virales sont causées par des entérovirus humains (HEV) (Rotbart, 2000) et ciblent principalement les enfants (Michos *et al.*, 2007). Cependant, plusieurs autres virus peuvent être responsables de méningites tels que le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) (Skogland, 1939), les virus herpès simplex (HSV)-1 et -2 (Olson *et al.*, 1967) et le virus de l'immunodéficience humaine (HIV)-1 (Hollander & Stringari, 1987). Puisque la plupart des infections chez l'adulte se résorbent sans séquelles, les informations concernant ces pathologies sont plutôt rares. Cependant, des travaux effectués sur des souris infectées avec le LCMV par voie intracérébrale ont permis d'élucider quelques mécanismes conduisant à la pathogenèse de la méningite. Ceux-ci ont montré que le LCMV cible les cellules des plexus choroïdiens, les cellules épendymales et les cellules de l'immunité innée et entraîne une méningite fatale, caractérisée par une infiltration leucocytaire et une vasculopathie des méninges qui conduisait à la mort des souris en 6–7 jours (Kang & McGavern, 2008; Kim *et al.*, 2008). La mortalité est associée en partie à une réponse antivirale cytotoxique T CD8<sup>+</sup> et à la présence de chimiokines dans les méninges qui favorisent une extravasation de monocytes et de neutrophiles et l'ouverture des jonctions serrées de l'endothélium, conduisant finalement à un œdème cérébral fatal (Kim *et al.*, 2008).

Certains virus qui infiltrent le parenchyme cérébral peuvent provoquer des encéphalites ou des méningo-encéphalites résultant en des céphalées, des convulsions et des désordres neurologiques importants (ataxie, coma). Les infections par les HEVs (ex. EV71, poliovirus)

représentent une cause importante d'encéphalites à travers le monde et la pathogenèse est principalement reliée aux effets cytopathiques viraux (apoptose) sur les neurones (Kuo *et al.*, 2002). Les virus de l'encéphalite japonaise (JEV) et West Nile (WNV), de la famille des *Flaviviridae*, présentent aussi des propriétés cytolytiques pour les neurones et sont une cause d'encéphalites, respectivement chez les enfants et les adultes (Chambers & Diamond, 2003). Cependant, à la différence des infections par les HEV, la réponse inflammatoire subséquente à l'infiltration leucocytaire dans le SNC et à la production de cytokines et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les neurones infectés contribuent aussi à la pathogenèse (Chao *et al.*, 1995; German *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2010). D'autres virus comme le HIV-1 et le virus de la rage ne sont pas directement cytopathiques mais causent des encéphalites par des mécanismes indirects qui aboutissent à des dysfonctions neuronales. Près de 50% des patients infectés par le HIV-1 présentent des complications neurologiques (Heaton *et al.*, 2010), mais la pathophysiologie impliquée est encore peu connue. Il a été suggéré que la production de cytokines inflammatoires et de ROS par les macrophages périvasculaires et la microglie infectés favorisaient un environnement neurotoxique (Burdo *et al.*, 2013; Kaul *et al.*, 2001). L'infection par le virus de la rage se traduit dans 80% des cas par une encéphalite, mais contrairement à celle induite par le HIV-1, l'immunopathologie ne serait pas en cause et impliquerait plutôt une dégénérescence des dendrites et des axones des neurones sans affecter leur viabilité (Jackson, 2015; Scott *et al.*, 2008). Enfin, l'encéphalite peut aussi survenir suite à des infections virales persistantes du SNC. Par exemple, le virus herpès simplex (HSV)-1, qui persiste sous forme latente dans le ganglion trijumeau suite à une infection primaire, est responsable de 90% des cas d'encéphalites causées par les HSV. Les mécanismes pathophysiologiques sont peu connus mais des données histologiques montrent des infiltrations inflammatoires périvasculaires et des neurones infectés et phagocytés par la microglie (Aurelius *et al.*, 1993; Hatanpaa & Kim, 2014). Le virus de la rougeole peut aussi établir une infection persistante dans le SNC et être à l'origine de la panencéphalite sclérosante subaiguë. Celle-ci se traduit d'abord par des désordres cognitifs puis des complications neurologiques et le coma (Griffin, 2014) consécutifs à une infection des neurones et des cellules gliales combinée à une infiltration leucocytaire (Anlar *et al.*, 2001; Esiri *et al.*, 1982).



Quelques virus neurotropes, tels que le WNV et le poliovirus, peuvent aussi migrer depuis des neurones périphériques vers le parenchyme de la moelle épinière et causer une myélite dont les effets cytopathiques sur les motoneurones peuvent conduire à une paralysie flasque aiguë (Leis *et al.*, 2003; Samuel *et al.*, 2007; Swanson & McGavern, 2015).

### **2.1.3- Mécanismes d'entrée des virus dans le SNC**

Plusieurs mécanismes peuvent être exploités par les virus neurotropes pour envahir le SNC mais ils se résument à deux modes d'entrée principaux: l'entrée directe via la circulation sanguine ou l'entrée indirecte via l'infection des nerfs périphériques (revue dans Swanson & McGavern, 2015). Bien que la majorité des virus aient une préférence pour l'une ou l'autre de ces voies d'entrées, certains peuvent exploiter les deux.

L'entrée virale indirecte dans le SNC implique l'infection de neurones sensitifs et moteurs dont les projections axonales périphériques s'étendent au-delà des barrières du SNC. L'expression différentielle de récepteurs viraux par ces neurones détermine le tropisme d'un virus neurotrope pour un type de neurone particulier. Par exemple, la liaison du poliovirus au récepteur viral CD155 et du virus de la rage à la molécule d'adhésion neuronale (NCAM) exprimés sur les motoneurones de la jonction neuromusculaire servent de point d'entrée vers le SNC pour ces virus (Salinas *et al.*, 2010). Le virus HSV-1 migre quant à lui vers le SNC via l'infection de neurones sensitifs de la peau ou de neurones olfactifs exprimant le récepteur viral Nectin-1 (Mata *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2005). Suivant l'infection des neurones périphériques, les virus détournent alors le système de transport axonal rétrograde à leur avantage pour remonter, depuis les boutons synaptiques situés en périphérie, vers le corps cellulaire du neurone situé dans le SNC (Hsieh *et al.*, 2010; Salinas *et al.*, 2010).

La majorité des virus exploitent cependant les systèmes de barrières cérébrales pour atteindre directement le SNC après avoir gagné la circulation sanguine systémique. C'est le cas des virus inhalés, comme le virus de la rougeole ou l'influenza, des virus ingérés comme les HEV ou encore des virus introduits directement dans le sang suite à une piqûre d'insecte (WNV,

JEV) ou un rapport sexuel (HIV-1) (revue dans Swanson & McGavern, 2015). Ces virus ont développé une ou plusieurs stratégies pour contourner la BHE et la barrière sang-LCR. Par exemple, il a été montré que la présence de capillaires fenestrés et d'une barrière sang-LCR moins étanche au niveau des plexus choroïdiens étaient des éléments exploités par certains virus, comme le cytomégalovirus, pour pénétrer le SNC (van Den Pol *et al.*, 1999). D'autres virus, tels que l'adénovirus murin (MAV)-1, le poliovirus ou le WNV peuvent traverser l'endothélium vasculaire de la BHE en infectant les cellules endothéliales (passage transcellulaire) leur permettant un accès rapide et direct au SNC (Coyne *et al.*, 2007; Gralinski *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2009). Dans plusieurs cas, comme lors d'infections par les virus HIV-1, JEV ou WNV, l'intégrité structurale de la BHE peut être compromise par l'induction locale de cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), de chimiokines (CCL2, CXCL10) ou de métalloprotéases (MMP-2, MMP-9) qui perturbent les jonctions serrées de l'endothélium favorisant le passage paracellulaire des virus vers le SNC (revue dans Daniels & Klein, 2015). Un dernier mode d'entrée virale ferait intervenir un mécanisme nommé « cheval de Troie » dans lequel des leucocytes infectés transporteraient le virus passivement au travers de la BHE (Spindler & Hsu, 2012). Ce mécanisme d'entrée serait privilégié par le HIV-1 qui serait véhiculé par des monocytes infectés transitant vers le SNC (Alexaki & Wigdahl, 2008). L'infiltration de ces monocytes au travers de la BHE serait associée à un renouvellement des populations de macrophages périvasculaires et/ou serait la conséquence d'une altération de la perméabilité vasculaire résultant de l'induction de CCL2 et de MMP-9 par l'infection virale (Ancuta *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2010).

## **2.2- La barrière hémato-encéphalique (BHE)**

Étant donné que la BHE constitue en superficie la principale interface entre la circulation sanguine périphérique et le SNC (1000 fois plus importante que la barrière sang-LCR), il n'est pas surprenant que la plupart des virus neurotropes hématogènes aient adopté des stratégies d'invasion de cette barrière. Néanmoins, par ses fonctions régulatrices et d'exclusion, la BHE permet d'isoler le parenchyme cérébral des variations quotidiennes de la composition chimique sanguine et de la majorité des agents pathogènes systémiques afin de garantir un

environnement propice à l'homéostasie dans le SNC (Hawkins & Davis, 2005). Le bris de la BHE, résultant de causes infectieuses ou non-infectieuses, peut donc être à l'origine de perturbations neurologiques importantes. Les propriétés fonctionnelles uniques de cette barrière sont directement en lien avec sa structure.

### **2.2.1- Structure et fonction de la BHE**

Les grandes artères pénétrant le SNC se ramifient en petites artères puis en artérioles composées d'une monocouche de cellules endothéliales entourée de péricytes et d'un nombre variable de couches de cellules musculaires lisses (Larochelle *et al.*, 2011). Plus profondément au niveau des microvaisseaux (capillaires et veinules post-capillaires), la membrane basale des EC fusionne avec celle du parenchyme cérébral entre lesquelles sont intégrés des péricytes. Des prolongements astrocytaires s'imbriquent dans la membrane basale du parenchyme pour former la *glia limitans* qui recouvre complètement la surface abluminale de l'endothélium microvasculaire (Fig. 2a). C'est précisément à cette structure particulière des microvaisseaux cérébraux que renvoie le terme de BHE (Bechmann *et al.*, 2007). Les péricytes, reliés fonctionnellement aux cellules musculaires lisses, protègent les EC de l'apoptose et stabilisent l'endothélium vasculaire alors que les astrocytes, par la production de facteurs de croissance, sont responsables de l'acquisition et du maintien de l'intégrité de la BHE (Pulzova *et al.*, 2009). Le fonctionnement optimal du SNC nécessite un environnement ionique et biochimique particulier qui doit être maintenu dans un spectre très étroit de concentrations pour ne pas perturber la physiologie neuronale. Alors que les composants moléculaires du sang diffusent normalement au travers de l'endothélium par la voie paracellulaire pour entrer dans la plupart des organes, l'endothélium de la BHE régule plus strictement l'accès des composants sanguins au SNC par un transport transcellulaire obligatoire. Plus spécifiquement, la BHE régule finement l'entrée des ions Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Ca<sup>++</sup> et le transport des molécules hydrophiles, facilitant l'entrée des nutriments requis (ex. glucose) et excluant l'afflux de molécules potentiellement nocives (Abbott *et al.*, 2006). La BHE procure aussi une protection significative contre l'invasion virale du SNC puisque plusieurs virus inoculés en périphérie ne peuvent induire une neuropathologie que lorsque la BHE est perturbée mécaniquement ou

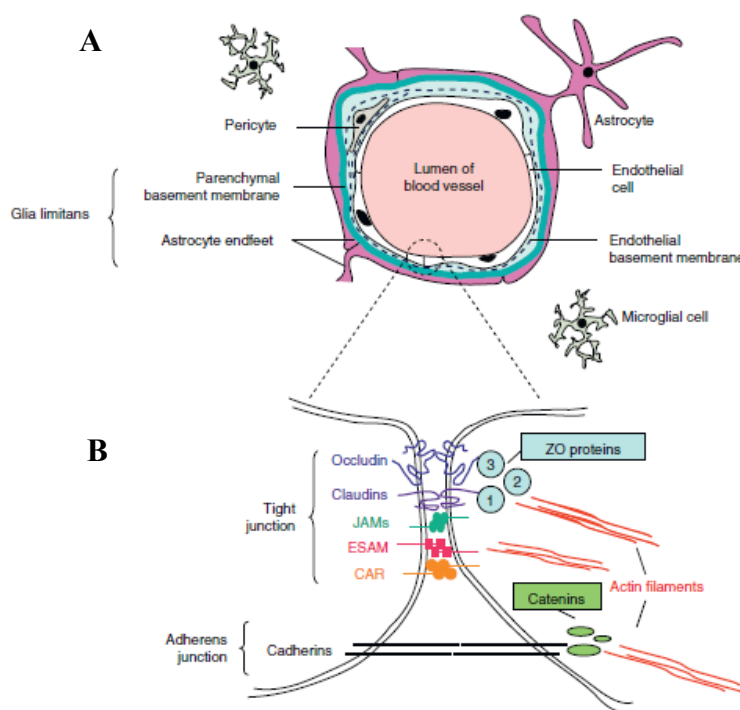
chimiquement (Hase *et al.*, 1990; Kobilier *et al.*, 1989; Lustig *et al.*, 1992). Ces propriétés uniques sont attribuables aux caractéristiques spécifiques des cellules endothéliales des micro-vaisseaux cérébraux (BMEC).

### **2.2.2- Caractéristiques des cellules des micro-vaisseaux cérébraux (BMEC)**

Les BMEC sont des cellules hautement spécialisées avec des caractéristiques structurales et fonctionnelles uniques qui les distinguent des EC de la périphérie. L'absence de fenestrations, la présence d'une membrane basale continue et d'un complexe unique de jonctions intercellulaires sont des modifications propres aux BMEC qui sont à l'origine de l'étanchéité remarquable de cette barrière (de Boer & Gaillard, 2006). Ces cellules sont soudées les unes aux autres par un assemblage de protéines d'adhérence, composé de cadhérines transmembranaires liées au cytosquelette par des caténines, et de protéines de jonctions serrées telles que les claudines et occludines, qui s'ancrent aux filaments d'actine cytoplasmiques via des molécules adaptatrices de type *zona occludens* (ZO) (Fig. 2b) (Spindler & Hsu, 2012). L'expression des jonctions serrées peut être influencée à la hausse par les glucocorticoïdes et l'IFN- $\beta$  ou encore à la baisse par des facteurs inflammatoires (cytokines, chimiokines, ROS) (de Boer & Gaillard, 2006). Les jonctions jouent un rôle majeur dans l'établissement d'une polarité au niveau des surfaces apicale et basolatérale des BMEC. En effet, en restreignant le mouvement des petits ions, tels les ions sodium ( $\text{Na}^+$ ) et chlore ( $\text{Cl}^-$ ), il en résulte une résistance électrique transendothéliale plus de 50 fois supérieure à celle des endothéliums périphériques contribuant à restreindre la perméabilité paracellulaire à des solutés polaires et chargés (Abbott *et al.*, 2006; Pulzova *et al.*, 2009).

En outre, les BMEC sont dotées d'un important système de transporteurs et de canaux ioniques situés sur les faces luminale et abluminale qui régulent l'entrée sélective des ions et des nutriments essentiels comme le glucose (transporteur GLUT-1) et les acides aminés (transporteur LAT-1). L'énergie nécessaire à ces systèmes de transports actifs est assurée par un contenu très élevé en mitochondries (Pulzova *et al.*, 2009). L'entrée de peptides et de protéines dans le SNC est généralement exclue par le complexe de jonctions serrées, mais

quelques protéines comme l'insuline et la transferrine sont transportées de manière spécifique via l'endocytose par récepteurs interposés (Pulzova *et al.*, 2009). Afin de protéger le SNC de l'action délétère des xénobiotiques et des toxines dérivées de pathogènes, les BMECs expriment plusieurs pompes d'efflux telles que les transporteurs ABC (ATP-binding cassette), par exemple la P-glycoprotéine (ABCB1), et les protéines de résistance multidrogue (MRP1–6). De plus, des enzymes métaboliques telles que la monoamine oxydase et le cytochrome P450 (1A et 2B) inactivent plusieurs composés neuroactifs et toxiques (Abbott *et al.*, 2006). Enfin, en comparaison avec les endothéliums périphériques, l'endothélium cérébral présente aussi de faible capacité de pinocytose ce qui contribue à restreindre le passage non-spécifique de molécules à travers la BHE (Laroche *et al.*, 2011).



### Figure 2. Structure de la BHE et des jonctions endothéliales

A) La BHE est composée d'une monocouche de EC soutenue par une membrane basale étroitement associée à la *glia limitans*, elle-même formée d'une membrane basale et de prolongements terminaux d'astrocytes. Des péricytes sont aussi associés à la surface abluminale des cellules endothéliales. B) Les EC sont soudées les unes aux autres par un ensemble complexe et unique de protéines de jonctions intercellulaires qui confèrent l'étanchéité à la BHE. Abréviations: JAMs, junctional adhesion molecules; ESAM, endothelial cell-selective adhesion molecule; CAR, Cocksackie and adenovirus receptor; ZO, *zona occludens*. (Spindler & Hsu, 2012)

### 2.2.2.1- Rôle des BMEC dans l'immunité innée

Dépourvu d'un système lymphatique, l'intégrité du SNC dépend exclusivement d'un système de défense innée (microglie, macrophages périvasculaires), alors qu'une réponse adaptative est seulement orchestrée dans des conditions spécifiques (Lampron *et al.*, 2013). En effet, en condition physiologique, les lymphocytes périphériques sont généralement exclus du SNC par l'étanchéité des jonctions serrées de la BHE et la faible expression de molécules d'adhésion à la surface des EC, ces dernières étant maintenues dans un état immunologiquement quiescent (Couraud, 1994). Cette exclusion particulière des lymphocytes s'explique par la faible capacité régénérative du tissu nerveux où des lésions aux neurones post-mitotiques, consécutives à une réponse immune adaptative intracérébrale, seraient plus dommageables qu'en périphérie (Holman *et al.*, 2011). Bien que le SNC fût longtemps considéré comme un site immunologiquement privilégié, les recherches récentes tendent plutôt à le définir comme un site immunologiquement spécialisé (Holman *et al.*, 2011).

Étant donné leur localisation à la surface luminale de la BHE, les EC sont les premières cellules en contact avec les agents pathogènes circulants. Ainsi, en plus de restreindre l'accès au SNC à une forte majorité d'agents pathogènes par leurs jonctions intercellulaires, elles peuvent constituer aussi une première ligne de défense innée par l'expression fonctionnelle de plusieurs récepteurs de reconnaissance de pathogènes (PRRs), particulièrement les récepteurs de type Toll (TLR)-2, -3, -4, -6 et -9 (Lampron *et al.*, 2013). L'activation de ces senseurs par des ligands bactériens (ex. LPS) ou viraux (ex. ARN ou ADN viral) est à l'origine de la production d'une variété de cytokines et chimiokines par les BMEC dont l'IL-1, -6, -8 (CXCL1), MCP-1 (CCL2) et le TNF- $\alpha$  (Verma *et al.*, 2006). Plus précisément dans le cas d'infections virales, il a été rapporté que l'infection des BMEC par le virus de la Dengue activait la production de cytokines inflammatoires suite à la détection virale par l'hélicase RIG-I (da Conceição *et al.*, 2013). Cependant, l'infection des BMEC ne semble pas toujours nécessaire à l'induction de cytokines. En effet, il a récemment été démontré que la protéine d'enveloppe du MSR/V (multiple sclerosis-associated retrovirus), un rétrovirus humain endogène appartenant à la famille W isolé de patients atteints de la sclérose en plaque,

stimulait la production d'IL-6 et d'IL-8 en se liant au TLR4 (Duperray *et al.*, 2015). Les BMEC seraient aussi capables de contrôler l'infection virale et de prévenir l'entrée de virus dans le SNC. En fait, il a été rapporté que la réplication du HIV-1 dans les BMEC est abrogée par l'activation du TLR3 et la production subséquente d'IFN- $\beta$  (Li *et al.*, 2013) et que la production d'IFN- $\beta$  par les BMEC suite à l'infection par le WNV favorisait le maintien de l'intégrité des jonctions serrées empêchant le transit du virus au travers de la BHE (Daniels *et al.*, 2014). Une fois activées, les BMEC augmentent aussi leur expression de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine-1) favorisant alors l'entrée de cellules inflammatoires dans le SNC. Les conséquences de l'infiltration leucocytaire dans le SNC peuvent favoriser l'élimination virale ou, au contraire, aggraver les lésions cellulaires, selon la nature de l'agent viral en cause et de la pathologie (Lampron *et al.*, 2013). Par exemple, il a été rapporté que lors d'infections par le virus de la rage et le WNV, l'infiltration leucocytaire favorisait l'élimination virale et la survie (Chai *et al.*, 2014; Klein *et al.*, 2005). Au contraire, lors d'infection par le HIV-1, le recrutement de monocytes est associé à la production de facteurs inflammatoires neurotoxiques qui aggravent la neuropathie (Williams *et al.*, 2014)

### **2.2.2.2- Dysfonctions des BMEC induites lors d'infections virales**

Bien que la production de cytokines et de chimiokines par les BMEC en réponse à la détection virale puissent favoriser une défense innée antivirale, elle peut aussi être à l'origine d'un bris de la BHE. En effet, plusieurs médiateurs inflammatoires sont reconnus pour perturber l'expression et la phosphorylation des protéines de jonction avec, pour conséquence, une augmentation de la perméabilité de la BHE. Tel que mentionné précédemment, ce mécanisme permet à plusieurs virus neurotropes de franchir la BHE. Les cytokines IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  et les chimiokines CCL2 et CXCL10 induites lors d'infection virales par les virus HIV-1, JEV, WNV et le virus de la rage sont responsables d'une altération de l'expression de protéines de jonction telles que la claudine-5, l'occludine et la ZO-1 (Chen *et al.*, 2014; Daniels & Klein, 2015; Spindler & Hsu, 2012). Les mécanismes moléculaires sous-jacents sont peu connus mais il a récemment été rapporté que l'IL-6 produite par les BMEC infectées par le JEV activait l'ubiquitine-protéine ligase E3 qui ciblait la dégradation de la ZO-1 (Chen

*et al.*, 2014). Aussi, le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  induits lors d'infection par le virus WNV stimulaient la signalisation par la RhoA GTPase kinase qui altérait l'expression de la claudine-5 et de la ZO-1 (Daniels *et al.*, 2014). La Rho kinase serait aussi impliquée dans la phosphorylation et l'ouverture des protéines de jonction occludine et claudine-5 chez les BMEC infectées par le HIV-1 (Persidsky *et al.*, 2006). D'autres virus perturbent les jonctions serrées, le cytosquelette d'actine ou encore la lamina basale des BMEC en stimulant la production de métalloprotéases (MMP) par les BMEC ou d'autres cellules connexes (ex. microglie, astrocytes). Par exemple, il a été rapporté que les virus HIV-1 et HSV-1 induisaient la production de MMP-2 et MMP-9, responsables de l'altération des protéines de jonction et/ou de la membrane basale (laminine) (Spindler & Hsu, 2012). Récemment, il a aussi été démontré que l'infection des BMEC par les entérovirus induisait la destruction du cytosquelette d'actine et d'importants réarrangements du réseau cytoplasmique des membranes et des mitochondries (Volle *et al.*, 2015). Dans quelques cas, l'altération structurale des BMEC peut être attribuée à l'infection virale elle-même ou à des produits viraux. Par exemple, l'infection des BMEC par le MAV-1 est associée à une importante modification microvasculaire et à une diminution de l'expression d'occludine et de claudine-5 indépendamment des facteurs inflammatoires (Gralinski *et al.*, 2009). D'autre part, les protéines virales gp120 et Tat du HIV-1 peuvent induire la libération d'enzymes protéolytiques et diminuer l'expression des claudine-5, occludine et/ou ZO-1 par des mécanismes impliquant la dégradation protéosomale ou la signalisation par les protéines RhoA et Ras (Avraham *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2012; Zhong *et al.*, 2008).

### **2.3- Les infections virales hépatiques**

Le foie est aussi l'objet d'infections par différents virus qui ciblent préférentiellement ou non les hépatocytes et qui se traduisent par une inflammation hépatique et des dommages tissulaires et fonctionnels. L'infection se caractérise par une phase aiguë de l'hépatite qui se résorbe le plus souvent spontanément mais qui, dans certains cas, peut progresser vers une phase chronique et aboutir à une fibrose, une cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire. L'évolution de l'hépatite dépend à la fois de l'agent viral en cause et de l'efficacité des



réponses immunes engagées dans le foie (Ishibashi *et al.*, 2009). À ce jour, aucun récepteur viral retrouvé exclusivement sur les hépatocytes ou dans le foie n'a été mis en évidence, si bien que l'hépatotropisme résulterait principalement des propriétés fonctionnelles et anatomiques particulières du foie. En effet, la combinaison du microenvironnement hépatique immunotolérant et des capacités de transcytoses exceptionnelles des cellules non-parenchymales hépatiques, prédispose le foie à des infections par des pathogènes circulants exploitant ces fonctions à leur avantage (Protzer *et al.*, 2012).

### **2.3.1- Structure et fonctions du foie**

Le foie est l'organe le plus volumineux du corps humain ( $\pm 1,5$  kg). Il joue un rôle majeur dans le métabolisme des protéines par la désamination, des glucides via la synthèse et l'entreposage du glycogène et la néoglucogenèse, et des lipides par la synthèse du cholestérol. Le foie assure aussi la production de la bile, la détoxification des xénobiotiques et l'élimination des produits bactériens dérivés de la flore intestinale (revue dans Protzer *et al.*, 2012). Au niveau structural et tissulaire, le foie se divise en cinq systèmes: le système vasculaire, les lobules hépatiques, le système réticulo-endothélial, le système biliaire et le stroma. Le parenchyme hépatique est organisé en unités fonctionnelles répétitives, les lobules hépatiques, qui consistent en un arrangement hexagonal d'hépatocytes alignés autour d'une veine centrale. Chaque lobule est irrigué à son extrémité par une triade porte composée d'un conduit biliaire et des ramifications de la veine porte hépatique et de l'artère hépatique (Hoehme *et al.*, 2010; Kowalewska *et al.*, 2011) (Fig. 3A). La vascularisation du foie est plus importante que celle de tout autre organe (Abdel-Misih & Bloomston, 2010) et son approvisionnement sanguin est unique de par sa double circulation sanguine. En effet, chaque lobule hépatique reçoit à la fois du sang oxygéné acheminé par l'artère hépatique et du sang désoxygéné, très riche en nutriments, apporté par la veine porte hépatique en provenance du système digestif (Fig. 3A). Les sangs artériel et portal se mélangent ensuite dans des microvaisseaux caractéristiques, les sinusoides, qui sont bordés par des EC uniques et où cohabitent différentes sous-populations immunes lymphoïdes (ex. cellules NK) et myéloïdes (ex. cellules de Kupffer (KC)) qui participent à l'élimination précoce des antigènes et des agents

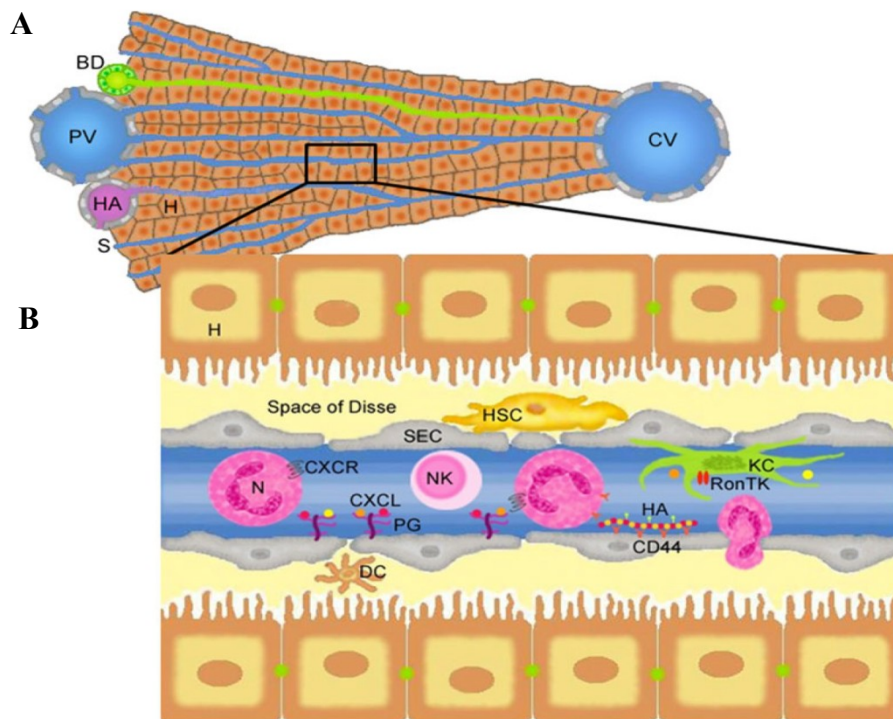
microbiens (Fig. 3B). Le sang est ensuite drainé par la veine hépatique centro-lobulaire vers la veine centrale qui ramène le sang vers la veine cave inférieure pour rejoindre la circulation systémique (Abdel-Misih & Bloomston, 2010; Ishibashi *et al.*, 2009; Nemeth *et al.*, 2009). Cette double circulation combinée à l'architecture lobulaire complexe du foie assurent le passage obligatoire des nutriments, toxiques et produits microbiens dérivés du système digestif vers le foie et une surface d'échange maximale entre le sang et les cellules hépatiques.

### **2.3.2- L'ambivalence immunitaire du foie : tolérance versus immunité**

Situé au carrefour des circulations systémique et porte, le foie est exposé à une charge antigénique permanente, tels que les antigènes alimentaires, les produits bactériens dérivés du microbiote intestinal (ex. LPS) et les pathogènes circulants. Conséquemment, le foie doit constamment discriminer les antigènes d'origine alimentaire devant être considérés comme inoffensifs de ceux pouvant être exprimés par des agents pathogènes afin d'établir la réponse appropriée au maintien de l'homéostasie hépatique. En d'autres termes, il doit, d'une part, favoriser la tolérance aux antigènes intestinaux afin de protéger le parenchyme hépatique des conséquences délétères que susciterait l'activation soutenue d'une réponse inflammatoire non désirée et, d'autre part, permettre une immunité innée rapide et efficace contre les agressions virales ou autres (Thomson & Knolle, 2010). Ces exigences antagonistes sont assurées par des populations cellulaires hépatiques uniques qui combinent souvent des fonctions régulatrices et immunes et qui peuvent agir, pour certaines, comme cellules présentatrices d'antigènes (CPA) dans des niches anatomiques distinctes.

### **2.3.3- Fonctions des cellules hépatiques**

Le foie est composé de plusieurs types cellulaires différents se catégorisant essentiellement en deux populations distinctes : les cellules parenchymateuses (hépatocytes), les plus nombreuses, et les cellules non parenchymateuses (NPC) (EC, cellules stellaires, de Kupffer, cellules dendritiques et lymphocytes) localisées dans les sinusoides hépatiques ou le parenchyme (Fig. 3B) (Ishibashi *et al.*, 2009).



### Figure 3. Structure d'une portion d'un lobule hépatique et d'un sinusoïde

A) Le sang de l'artère hépatique (HA) et celui de la veine porte hépatique (PV) acheminés au niveau de la triade porte des lobules hépatiques se mélangent dans les sinusoides (S), bordées par les cellules endothéliales sinusoidales (SEC), puis est drainé par la veine centrale (CV). La bile produite par les hépatocytes (H) est recueillie par les conduits biliaires (BD). B) Les sinusoides sont peuplés de cellules résidentes, telles que les cellules stellaires (HSC) qui résident dans l'espace de Disse, et des cellules de Kupffer (KC) et tueuses naturelles (NK) intraluminales. Des neutrophiles (N) sont recrutés dans les sinusoides lors d'une réponse inflammatoire hépatique. (Kowalewska *et al.*, 2011)

#### 2.3.3.1- Les hépatocytes

Les hépatocytes constituent les principales cellules du foie, représentant 70% des cellules totales et 80% du volume hépatique (Fig. 3B), et assurent la majorité des fonctions métaboliques hépatiques telles que la néoglucogénèse, la glycogénèse, la détoxification et la production de la bile (revue dans Protzer *et al.*, 2012). Les hépatocytes jouent également un rôle prépondérant dans l'immunité innée locale et systémique. En effet, en réponse aux cytokines inflammatoires produites lors d'une infection, ils sécrètent d'importantes quantités de protéines de la phase aiguë telles que la protéine C-réactive (CRP), les lectines liant le

mannose (MBL)) et les composants du complément (Liaskou *et al.*, 2012). Ils sont aussi d'importants producteurs d'une variété de cytokines et de chimiokines, dont l'IL-6, le TNF- $\alpha$ , le CCL2, le CXCL1, et le CXCL10 qui peuvent contribuer à la pathophysiologie et/ou au processus de réparation lors de pathologies hépatiques (Dong *et al.*, 1998; Saiman & Friedman, 2012). Les hépatocytes constituent la cible cellulaire majeure de plusieurs virus hépatotropes mais des données récentes leur attribuent aussi un rôle actif dans la défense innée antivirale. En effet, il a été démontré que les hépatocytes exprimaient les TLR1–9 et répondaient activement aux ligands TLR2 et TLR4 par la production de cytokines, et libéraient des interférons (IFN) de type I en réponse à une stimulation du TLR3 et de l'hélicase RIG-I (Nakamoto & Kanai, 2014; Preiss *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009). Il a aussi été rapporté que les hépatocytes produisaient des cytokines antivirales en réponse à l'activation du TLR3 par le virus de l'hépatite C (HCV) et pouvaient contrôler *in vitro* sa réplication via la production d'IL-29 (Li *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2012). De plus, l'expression constitutive de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)-I et du CD1d indique un potentiel de présentation antigénique et d'interaction avec les cellules T cytotoxiques et les cellules NK-T (Nemeth *et al.*, 2009).

### 2.3.3.2- Les cellules stellaires (HSC)

Les HSC, localisées au niveau de l'espace de Disse (Fig. 3B), représentent moins de 1% des NPC et sont impliquées dans la mise en réserve de la vitamine A absorbée au niveau intestinal et de sa conversion en acide rétinoïque. Elles sont aussi essentiellement responsables de la production de la matrice extracellulaire (collagène I, III et IV) dans le foie et joue un rôle dans la régulation du flot sanguin des sinusoides hépatiques (Crispe, 2009; Ishibashi *et al.*, 2009). Suivant l'activation par des agents profibrogéniques, les HSC peuvent adopter un phénotype myofibroblastique et contribuer à la fibrose caractéristique de certaines pathologies hépatiques (Nemeth *et al.*, 2009). Par l'expression des CMH-I et -II et du CD1d, elles contribueraient également à la défense immunitaire hépatique à titre de cellules présentatrices d'antigènes aux cellules T CD4, T CD8 et NK-T. Une fois activées, les HSC expriment aussi les TLR2, TLR4 et TLR9, et répondent à leurs ligands respectifs par la sécrétion d'IL-6, de TGF- $\beta$ 1 et de MCP-1 (Nakamoto & Kanai, 2014).

### 2.3.3.3- Les cellules de Kupffer (KC)

Les KC sont des macrophages qui résident en permanence dans la lumière des sinusoides (Fig. 3B) et représentent 20% des NPC du foie et 80-90 % de l'ensemble des macrophages tissulaires de l'organisme (Ishibashi *et al.*, 2009; Nakamoto & Kanai, 2014). Ils originent de l'auto-renouvellement des populations locales et/ou des monocytes circulants dérivés de la moelle osseuse (Naito *et al.*, 1997). À la différence des autres macrophages tissulaires, leur localisation intravasculaire les expose directement aux antigènes entériques et systémiques circulants, favorisant l'élimination rapide de ces derniers. De surcroît, la population de KC distribuée dans la région périportale, immédiatement en contact avec les antigènes et autres molécules du flot sanguin, est principalement affectée à cette tâche par ses activités phagocytaire et lysosomiale très importantes (Liaskou *et al.*, 2012) jouant un rôle crucial dans l'élimination des débris cellulaires, apoptotiques et des complexes immuns (Nemeth *et al.*, 2009). À cet effet, ces KC expriment toute une gamme de PRR tels que les récepteurs TLR et les SR-AI/AII, le récepteur au mannose et des récepteurs Fc- $\gamma$  (Liaskou *et al.*, 2012). Continuellement exposés au LPS, ils présentent un phénotype tolérogénique. En effet, l'activation soutenue du TLR4 par l'endotoxine entraîne l'induction de facteurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10 et la PGE2 favorisant l'élimination et la tolérance hépatique à l'égard de l'endotoxine (Grewe *et al.*, 1992; Knolle *et al.*, 1995; Liaskou *et al.*, 2012). La population de KC située en périphérie de la veine centrale est plutôt affectée à la reconnaissance des motifs moléculaires associés aux agents pathogènes bactériens ou viraux par l'expression de plusieurs TLR (TLR-2, -3, -4 et -9) qui, lorsqu'activés, mènent à la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-6, l'IL-12, l'IL-18, le TNF- $\alpha$  et l'oxyde nitrique (NO) (Kowalewska *et al.*, 2011). L'IL-12 et l'IL-18 stimulent en synergie la production d'IFN- $\gamma$  antiviral par les cellules NK (Seki *et al.*, 2002). Les KC peuvent aussi agir comme cellules présentatrices d'antigènes effectrices. Par exemple, lors d'infection par le HCV, elles expriment de hauts niveaux de CMH-I et -II et les ligands de co-stimulation CD40 et CD80 essentiels à l'activation des cellules T (Burgio *et al.*, 1998). Ainsi, ces macrophages spécialisés permettent l'élimination de pathogènes et d'antigènes dérivés du tractus gastro-intestinal prévenant alors leur entrée dans la circulation systémique.

#### 2.3.3.4- Les cellules dendritiques (DC)

Le foie abrite plusieurs sous-populations hétérogènes de DC dont les DC myéloïdes (CD11c+), principalement distribuées dans les sinusoides près de la veine centrale et de la triade porte, et les DC plasmacytoïdes (CD123+) qui parsèment le parenchyme hépatique (Hsu *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2001). Des sous-populations lymphoïdes (CD8a+) et DC-NK (présentant les marqueurs DX5 et CD69 des cellules NK) ont aussi été rapportées chez la souris (Chen *et al.*, 2007; Lian *et al.*, 2003). Constituant moins de 1% des NPC hépatiques, les DCs sont les cellules présentatrices (CPA) professionnelles du foie et combinent, comme la plupart des cellules hépatiques, des fonctions régulatrices et immunes (Hsu *et al.*, 2007). Les DC myéloïdes expriment les TLR-2, -3, -4, -5, -8 et se spécialisent dans la présentation antigénique et l'induction des réponses immunes adaptatives de type Th1 par la production d'IL-12 et d'IL-18 (Ueno *et al.*, 2007). Les DC plasmacytoïdes expriment les senseurs viraux TLR-7, -8, et -9 et constituent la principale source d'interféron (IFN)- $\alpha$  en réponse aux infections virales (Altfeld *et al.*, 2011; Siegal *et al.*, 1999). La forte densité de DC plasmacytoïdes dans le foie, plus importante que dans tout autre organe, est cohérente avec la charge antigénique à laquelle il est soumis (Crispe, 2009). Par ailleurs, en raison de l'exposition permanente du foie aux antigènes intestinaux, les DC hépatiques arborent un phénotype immunogénique immature caractérisé par une faible expression des CMH et des molécules de co-stimulation CD40, CD80 et CD86 (Liaskou *et al.*, 2012). Elles régulent aussi à la baisse leur expression du TLR4 et tendent à adopter un caractère tolérogénique en sécrétant préférentiellement l'IL-10 (Goddard *et al.*, 2004). Les DC plasmacytoïdes seraient aussi habilitées à stimuler l'activité des cellules T régulatrices (Treg), favorisant la tolérance hépatique en condition physiologique (Hadeiba *et al.*, 2008).

#### 2.3.3.5- Les lymphocytes T et B

Le foie contient aussi des lymphocytes B et diverses sous-populations de lymphocytes T distribuées dans le parenchyme et comptant pour environ 5% des NPC (Bogdanos *et al.*, 2013). Ces cellules participent aux défenses immunes adaptatives humorales et cellulaires et jouent un rôle clé dans la résolution d'infections hépatiques. Une grande diversité de

lymphocytes T est observée dans le foie, comprenant des populations de T CD8+, T CD4+ Th1, Th2, Th17 et Treg. Chez l'humain, les cellules T CD8+ sont plus abondantes que l'ensemble des sous-populations T CD4+ alors que c'est l'inverse chez la souris (Nemeth *et al.*, 2009). Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques sont spécialisés dans l'élimination de virus infectant les hépatocytes. Cette élimination peut faire intervenir des mécanismes cytolytiques, médiés par leurs granules cytotoxiques (perforines/granzymes) et/ou leur ligand de mort (FasL), ou des mécanismes non cytolytiques impliquant la sécrétion de cytokines qui interfèrent avec la réplication virale sans destruction des hépatocytes. Un mécanisme non conventionnel, enclenché suite à une présentation antigénique croisée et menant à une sensibilité accrue des hépatocytes infectés à l'induction de mort par le TNF- $\alpha$ , a aussi été rapporté (revue dans Knolle & Thimme, 2014). La prédominance de cellules T CD8+ par rapport aux T CD4+ dans le foie humain pourrait être reliée à une forte présence de T CD8+ régulatrices ou encore à une rétention plus importante des T CD8+ circulants (Klugewitz *et al.*, 2004a). Plusieurs sous-populations de cellules T CD8 régulatrices (ex. CD8+ FoxP3+, CD8+ CD28-, CD8+ CD103+), exprimant des fonctions immunosuppressives ont été identifiées dans le foie humain (Koch *et al.*, 2008; Nemeth *et al.*, 2009; Boer *et al.*, 2014) mais une surabondance de leur expression par rapport au foie de souris reste à confirmer.

La fréquence des lymphocytes T CD4+ effecteurs et mémoires est plus importante dans le foie que dans les organes immuns (Klugewitz *et al.*, 2004b). Les cellules CD4+ Th1 sont principalement responsables de l'initiation des réponses immunes cellulaires contre les pathogènes intracellulaires via la production d'IFN- $\gamma$  alors que les CD4+ Th2 stimulent la réponse humorale contre les pathogènes extracellulaires en activant les lymphocytes B et le recrutement intrahépatique d'éosinophiles (Liew, 2002). La sous-population CD4+ Th17, plus récemment caractérisée, serait un élément important de l'inflammation locale chronique en participant au recrutement intrahépatique des neutrophiles via la production des IL-17, -21 et -22 (Zambrano-Zaragoza *et al.*, 2014). Les Th17 sont associés à la pathogénèse de plusieurs maladies autoimmunes et une augmentation de cette population a été rapportée dans les foies cirrhotiques et chez des patients chroniquement infectés par le HCV (Kondo *et al.*, 2014; Lan *et al.*, 2009). Les différents types de cellules CD4+ Treg sont responsables, par leurs fonctions

suppressives, du contrôle de l'activité des cellules immunes intrahépatiques. Elles peuvent supprimer, par contact direct (Treg naturelles) ou via la production des cytokines immunosuppressives IL-10 et TGF- $\beta$  (Tr1 et Th3), l'activation, la prolifération, la différenciation et les fonctions effectrices des cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, des cellules B, des NK et NKT et des DC (Knolle & Thimme, 2014; Manigold & Racanelli, 2007). Quoiqu'elles participent activement à la tolérance homéostatique du foie, les cellules CD4<sup>+</sup> Treg sont étonnamment cent fois moins nombreuses que dans les ganglions lymphatiques ou la rate (revue dans Nemeth *et al.*, 2009). Cependant, leur nombre augmente considérablement dans le foie suite à l'activation locale ou périphérique des T CD8<sup>+</sup> (Bochtler *et al.*, 2008), expliquant leur présence augmentée lors d'infections chroniques par les virus HCV et HBV (Rushbrook *et al.*, 2005; Sugimoto *et al.*, 2005).

Moins de 10% des lymphocytes intrahépatiques sont des cellules B (Klugewitz *et al.*, 2004). Chez la souris, bien qu'elles expriment des niveaux inférieurs de CD21 et CD23 et supérieurs de CD5, les cellules B sont fonctionnellement similaires aux cellules B2 spléniques conventionnelles et sont dédiées à la production d'anticorps et à la réparation tissulaire en réponse à des agressions (Novobrantseva *et al.*, 2005). Cependant, chez l'humain, la majorité des cellules B présentent les caractéristiques associées au phénotype B1 : diversité restreinte du répertoire, récepteur (BCR) polyspécifique et production dominante d'IgM de faible affinité indépendante des cellules Th2 (Dalloul, 2009; Martin & Kearney, 2000; Tatu *et al.*, 1999). Ces lymphocytes B peu spécifiques feraient le pont entre les défenses innées et adaptatives du foie et contribueraient aussi à la tolérance hépatique par la sécrétion d'IL-10 (O'Garra *et al.*, 1992).

### **2.3.3.6- Les cellules NK et NK-T**

Les cellules NK et NK-T sont des lymphocytes de l'immunité innée qui patrouillent les sinusoides hépatiques (Fig. 3B) agissant comme sentinelles (Kowalewska *et al.*, 2011). Le foie, plus que tout autre organe, est fortement enrichi de cellules NK et NKT représentant respectivement 40-50% et 20-30% des lymphocytes intrahépatiques chez l'humain (Liaskou *et al.*, 2012). Les cellules NK jouent un rôle clé dans l'immunité innée antivirale contre des virus



hépatotropes comme le cytomégalovirus et le HBV (Szomolanyi-Tsuda *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2010) et seraient associées à la résolution des infections aiguës par le HCV (Khakoo *et al.*, 2004). Les cellules NK tuent les cellules infectées spontanément, sans sensibilisation préalable alors que les cellules NK-T, qui expriment un récepteur de cellules T (TCR) invariant, doivent d'abord être activées par les KC suite à la présentation, via la molécule CD1d, d'antigènes glycolipidiques (revue dans Nemeth *et al.*, 2009). Une fois activées, les cellules NK et NK-T induisent l'apoptose des cellules cibles par la libération de granules cytotoxiques (perforine et granzyme) ou par l'engagement de leurs ligands de mort FasL ou TRAIL (Crispe, 2009). Les cellules NK hépatiques expriment aussi les TLR1-9, à l'exception du TLR5, et lorsque stimulées par des agonistes spécifiques, elles répondent par la production d'IFN- $\gamma$  et des chimiokines CCL3, CCL4 et CCL5 (Sawaki *et al.*, 2007). Les cellules NKT activées produisent aussi plusieurs cytokines Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) et Th17 (IL-17, IL-22) qui activent d'autres cellules de l'immunité innée et adaptative (Swain, 2008).

### **2.3.3.7- Les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques (LSEC)**

Les LSEC représentent environ 50% des cellules non-parenchymateuses du foie. Elles se distinguent des cellules endothéliales périphériques à plusieurs égards en arborant des caractéristiques uniques qui reflètent le caractère plurifonctionnel du foie. En effet, perforées par de nombreuses fenestrations et ne produisant pas de jonctions serrées ni de membrane basale définie, l'architecture des LSEC permet un transfert rapide des glucides, protéines et lipides vers la circulation systémique ou le parenchyme hépatique selon les besoins de l'organisme (Kowalewska *et al.*, 2011). Le diamètre et le nombre de fenestrations ne sont pas statiques, ils évoluent de manière dynamique et sont influencés par plusieurs facteurs tels que le VEGF. La défenestration des sinusoides hépatiques conduit à une perturbation importante des échanges sang-foie et est un facteur contributif majeur des dysfonctions hépatiques associées à la cirrhose (Babbs *et al.*, 1990). Les LSEC assurent aussi une fine régulation du débit sanguin dans les sinusoides par la production locale d'oxyde nitrique (NO), via l'enzyme membranaire eNOS (endothelial NO synthase) localisée dans les fenestrations (Yokomori *et al.*, 2012), et peuvent déclencher l'hémostase par l'expression membranaire de la prothrombinase fgl2 (Ghanekar *et al.*, 2004). Les LSEC sont, en outre, dotées de capacités

endocyttaire, pinocytaire et de transcytose phénotypiques par l'expression de plusieurs récepteurs, tels que le récepteur éboueur, le récepteur au mannose et les récepteurs Fc $\gamma$ , qui contribuent à l'élimination efficace d'antigènes et de particules solubles et colloïdales (Bouwens *et al.*, 1992). À cet effet, il a été démontré que les LSEC seraient davantage efficaces (90%) que les KC (10%) dans l'élimination des virus circulants (Ganesan *et al.*, 2011) et qu'elles étaient les principales cellules impliquées dans la capture des virus HBV et HCV (Breiner *et al.*, 2001; Pöhlmann *et al.*, 2003). Ces facultés endocyttaires seraient en partie liées aux nombreuses invaginations de leur membrane, les caveolae, et leur principal composant structural, la cavéoline-1, enrichie près des fenestrations et dans les organites cytoplasmiques impliqués dans l'endocytose et le trafic moléculaire intracellulaire (Smedsrød *et al.*, 1985; Yokomori *et al.*, 2012).

Les LSEC sont également les principales cellules hépatiques responsables de la tolérance homéostatique à l'égard des antigènes alimentaires et de la flore intestinale. À l'instar des KC et des DC, elles libèrent de manière constitutive de l'IL-10 au contact du LPS (Tiegs & Lohse, 2010). Par leur expression constitutive des CMH-I et -II et des molécules de co-stimulation CD40, CD80 et CD86 (Knolle *et al.*, 1999) elles peuvent aussi agir comme CPA mais leur phénotype immature et peu immunogénique favorise la différenciation des cellules T CD4 naïves en cellules Treg plutôt qu'en cellules effectrices (Kruse *et al.*, 2009) et supprime la prolifération des cellules T CD8 activées par un mécanisme dépendant de leur ligand inhibiteur B7-H1 (PD-L1) (Diehl *et al.*, 2008). Les LSEC peuvent cependant agir comme sentinelles et signaler la présence virale par l'expression de plusieurs PRR dont les TLR-1 à -9 et les hélicases RIG-I et MDA-5, et la production de TNF- $\alpha$ , IL-6 et d'IFN- $\beta$  (Nakamoto & Kanai, 2014; Wu *et al.*, 2010). D'ailleurs, il a été démontré que l'activation du TLR3 et la production subséquente d'IFN- $\beta$  par les LSEC inhibent la réplication du HCV dans une lignée hépatocytaire (Broering *et al.*, 2008). Néanmoins, la stimulation de ces PRR ne semblerait pas suffisante pour induire leur maturation en CPA immunogénique compétente, démontrant leur caractère tolérogénique intrinsèque (Kern *et al.*, 2010). Une étude récente a cependant rapporté que l'activation des LSEC par un ligand TLR1/2 seulement, pouvait renverser leur phénotype tolérogénique et promouvoir une immunité antivirale efficace par l'activation de

cellules T CD8<sup>+</sup> (Liu *et al.*, 2013). L'infection virale des LSEC semble aussi supplanter leurs propriétés tolérogéniques et favoriser une présentation fonctionnelle des antigènes viraux aux cellules T CD8 par un mécanisme inconnu mais indépendant des CD80 et CD86 (Kern *et al.*, 2010). Étant parmi les premières cellules en contact avec les agents viraux circulants, les LSEC peuvent rapidement signaler le danger par la production d'IL-33, une alarmine libérée lors d'agression cellulaire, qui active les cellules de l'immunité innée (Arshad *et al.*, 2012; Moussion *et al.*, 2008). Une surexpression d'IL-33 par les LSEC a d'ailleurs été rapportée chez des patients infectés chroniquement par les HBV et HCV (Marvie *et al.*, 2010).

En plus de participer directement à la défense innée antivirale, les LSEC sont essentielles au recrutement intra-hépatique des cellules inflammatoires, telles que les neutrophiles et les lymphocytes T et B, lorsque l'infection atteint le parenchyme. En effet, bien qu'il ait été longtemps cru que la fenestration des LSEC permettait un libre accès des leucocytes au parenchyme hépatique pour l'immunosurveillance, des données récentes ont révélé que des interactions avec les LSEC étaient préalables à l'infiltration leucocytaire (Géraud *et al.*, 2012). Cependant, à la différence des autres cellules endothéliales, les LSEC n'expriment pas les sélectines E et P. Conséquemment, l'adhésion et l'extravasation des leucocytes circulants n'impliqueraient que des interactions avec les molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et peu ou pas avec le CD31, exprimées à la surface des LSEC (Géraud *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 1997).

Le rôle des LSEC dans la pathogenèse de l'hépatite virale est inconnu mais un débalancement du fragile équilibre entre la tolérance et l'inflammation lors de la phase aiguë de l'infection pourrait avoir des conséquences importantes sur la sévérité et l'issue de l'hépatite.

### **2.3.4- Les hépatites virales**

Bien que la majorité des pathogènes circulants soient rapidement éliminés par les cellules du système réticulo-endothélial des sinusoides, la tolérogénicité inhérente du foie le prédispose aux infections aiguës et/ou chroniques par des pathogènes qui exploitent cet environnement

favorable à l'évasion des défenses immunes. C'est le cas de plusieurs virus causant des hépatites, dont les principaux sont le virus de l'hépatite A (HAV), le HBV, le HCV et les virus de l'hépatite D (HDV) et E (HEV).

Les HAV et HEV, des virus à génome ARN appartenant respectivement à la famille des *Picornaviridae* et *Hepeviridae*, sont responsables d'une forte incidence d'hépatites A et E dans les pays émergents où les conditions sanitaires sont limitées, et ce en dépit de l'existence de vaccins commercialement disponibles (Hoofnagle *et al.*, 2012; Walker *et al.*, 2015). Ces virus se transmettent par la voie oro-fécale et gagnent le foie par la circulation entéro-hépatique après avoir traversé l'épithélium intestinal. Ils provoquent des hépatites aiguës dont l'évolution est généralement favorable et ne présentent pas de risques significatifs de progression vers une forme chronique (Thomas & Zoulim, 2012). Des observations cliniques et expérimentales ont montré que la réplication intensive du HAV dans les premiers jours suivant l'infection ne se traduisait que par une inflammation hépatique légère dans les 3 à 4 semaines post-infection (Lemon *et al.*, 1990). Ce délai s'expliquerait par la capacité du HAV à s'évader de la réponse IFN dans la phase aiguë de l'infection en perturbant les voies de signalisation dépendantes des hélicases RIG-I et MDA5 et du TLR3 dans les hépatocytes infectés (Qu *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2007).

Le HBV, un virus à ADN membre de la famille *Hepadnaviridae*, est responsable de plus de 400 millions de cas d'hépatites à travers le monde. Se transmettant par voie sexuelle, sanguine ou materno-fetale, il cause des infections aiguës qui, dans certains cas, progressent vers une forme chronique souvent asymptomatique mais qui peut éventuellement mener au développement d'une cirrhose et d'un carcinome hépatique (revue dans Busca & Kumar, 2014). Par ailleurs, une forte prévalence de l'infection par HBV a récemment été rapportée chez des patients atteints du lymphome primaire du SNC (Meng *et al.*, 2015). La disponibilité d'un vaccin a fait reculer de manière considérable les taux de morbidité et de mortalité associés à l'infection par HBV (Thomas & Zoulim, 2012). Le HDV est un virus à ARN défectif, nécessitant la présence du HBV pour l'infection productive des hépatocytes. La prévalence est élevée dans certaines régions tropicales et sub-tropicales et les voies de transmission sont les mêmes que pour le HBV. La co-infection HBV/HDV induit un risque

accru d'hépatite aiguë sévère, voire d'hépatite fulminante (5 à 10 % des cas) alors que la progression vers la chronicité est très rare (Ranger-Roger *et al.*, 2002).

Le HCV est un virus à génome ARN de la famille des *Flaviviridae* se transmettant principalement par voie sanguine. Contrairement au HBV, la majorité des infections aiguës (60-80%) progresse vers la chronicité si bien que le HCV représente la cause majeure des hépatites chroniques, des cirrhoses et des carcinomes hépatocellulaires affectant près de 170 millions de personnes mondialement (Rehermann & Nascimbeni, 2005; Horner, 2014). L'infection aiguë peut dans certains cas évoluer vers une forme fulminante provoquant une insuffisance hépatique aiguë caractérisée par une nécrose, des dysfonctions hépatocellulaires extensives et une inflammation exacerbée causant la mort dans plus de 80% des cas (Liu *et al.*, 2001)

Le risque de progression vers la persistance lors d'infections par le HBV et le HCV est en relation avec des mécanismes viraux d'évasion des défenses innées hépatiques. Par exemple, il a été rapporté que l'expression des TLR-1, -2, -4, -6, -7 et -9 était diminuée dans les cellules mononucléaires périphériques (PBMCs) chez les patients infectés chroniquement avec le HBV (Chen *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008) et que la signalisation par les TLR-2 et -4 était associée à une diminution de production de cytokines inflammatoires et une augmentation de la réponse immunosuppressive dépendante des cellules Treg (Chen *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010). L'infection *in vitro* d'hépatocytes et de KC par des virions HBV ou l'exposition de ces cellules à des protéines virales a aussi été rapportée pour supprimer l'induction d'IFN- $\beta$  par des agonistes des TLR (Wu *et al.*, 2009). Le HCV est reconnu par différents PRR dont les TLR-2, -3, -4 et -7 et l'hélicase RIG-I (Broering *et al.*, 2011; Seki & Brenner, 2008), mais au contraire de l'infection par HBV, leur expression augmente chez les patients infectés chroniquement (Riordan *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2007). La signification et les conséquences de cette augmentation des PRR dans la pathogénèse sont cependant inconnues. En parallèle, le HCV supprime spécifiquement la production d'IFN- $\beta$  en interférant avec la signalisation médiée par le TLR3 (Li *et al.*, 2005). Il a récemment été suggéré qu'un déficit fonctionnel des défenses innées des macrophages en relation avec le TLR3 lors de la phase aiguë de l'infection pourrait favoriser la persistance du HCV (Osburn *et al.*, 2013; Qian *et al.*, 2013).

Un blocage de la signalisation par le RIG-I dans les hépatocytes infectés et l'induction de dysfonctions dans les réponses cytotoxiques des cellules NK contribueraient aussi à sa persistance (Barnaba, 2010).

### **2.3.5- Dysfonctions des LSEC induites lors d'hépatites virales**

Des dysfonctions dans l'immunité innée antivirale par les LSECs ont été rapportées lors d'infections par les virus HBV et HCV. D'abord, il a été démontré que ces virus peuvent exploiter à leur avantage les capacités de transcytose des LSEC, via le récepteur DC-SIGN, pour atteindre indemne le parenchyme et infecter les hépatocytes (Breiner *et al.*, 2001; Pöhlmann *et al.*, 2003). Il a aussi été rapporté que le HBV pouvait supprimer la production d'IFN- $\beta$  par les LSEC (Hösel *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). Lors d'infection par le HCV, bien qu'elles ne soient peu ou pas permissives à la réplication virale, les LSEC constitueraient un réservoir de HCV et favoriseraient la transmission du virus vers les hépatocytes puis ensuite sa réplication par la production de la protéine morphogénétique osseuse 4 (BMP4) (Rowe *et al.*, 2014). En effet, il a été démontré que la liaison du HCV au ligand L-SIGN des LSEC favorisait sa transcytose vers le parenchyme hépatique, un mécanisme qui pourrait être privilégié par le virus pour s'échapper des voies endocytaires menant à la dégradation dans les lysosomes et demeurer présent dans la cellule (Ludwig *et al.*, 2004). Enfin, une augmentation de l'expression de la cavéoline-1 a aussi été rapportée dans les foies cirrhotiques de patients infectés par HCV (Yokomori *et al.*, 2015). La sur-expression de cavéoline-1 contribuerait à la résistance intravasculaire hépatique et à l'hypertension portale caractéristiques des patients cirrhotiques, en régulant à la baisse l'activité de la NOS endothéliale et la production subséquente du facteur vasodilatant NO (Kwok *et al.*, 2009; Yokomori *et al.*, 2003). Néanmoins, la conséquence des anomalies vasculaires et des défenses innées des LSEC dans la pathogénèse de l'hépatite est encore peu connue.

## **2.4- Les mécanismes de l'immunité innée dans le foie**

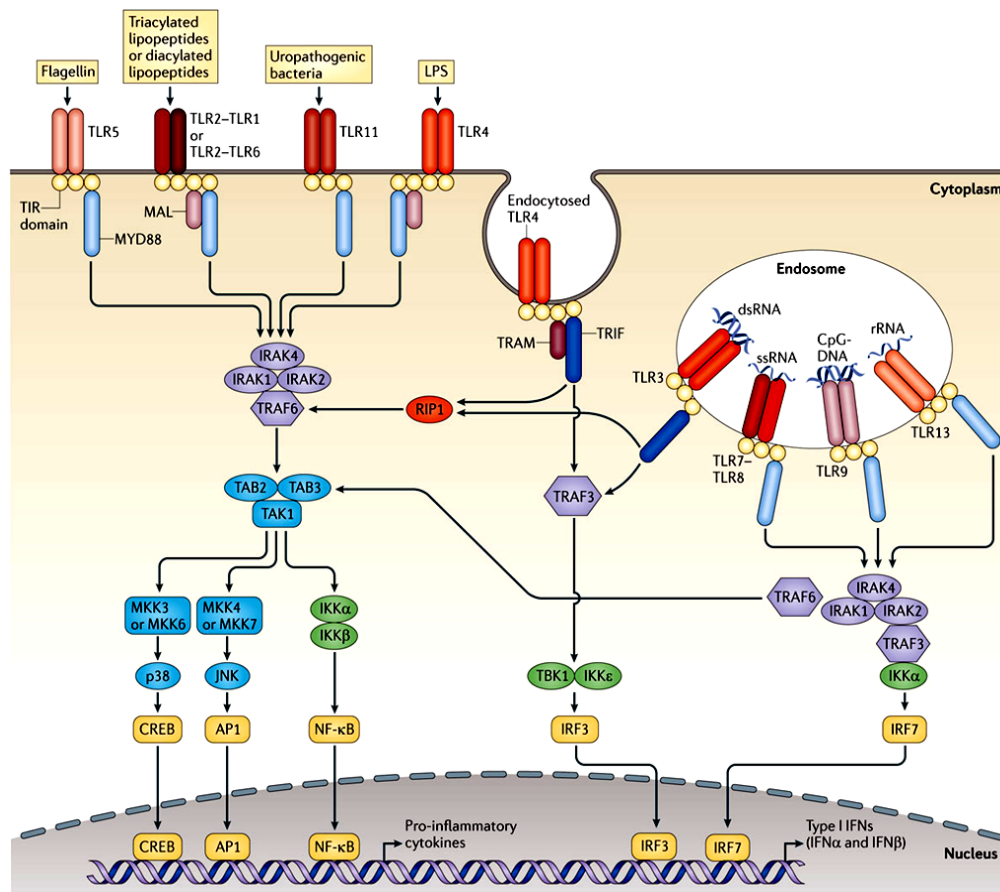
L'immunité innée est la première ligne de défense de l'organisme et ses mécanismes favorisent l'initiation rapide et ordonnée d'une réponse inflammatoire contre les agressions microbiennes. L'inflammation aiguë est sous-jacente à de nombreux processus physiologiques et pathologiques et joue un rôle déterminant dans la protection de l'hôte par l'élimination des pathogènes envahissants et l'initiation des processus de réparation tissulaire destinés à restaurer l'homéostasie (revue dans De Nardo, 2015). Les mécanismes effecteurs immédiats de l'immunité innée reposent sur l'existence de multiples PRR hautement conservés, tels que les TLR et hélicases, exprimés par un éventail de cellules mais plus particulièrement par les cellules de l'immunité innée (ex. neutrophiles, macrophages). Ces cellules et leurs récepteurs scrutent l'environnement local pour la détection de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) ou de motifs moléculaires endogènes (DAMP) associés à des molécules altérées ou relâchées suivant la nécrose cellulaire (ex. alarmines). La large gamme de motifs reconnus par les PRR ainsi que leur localisation dans différents compartiments cellulaires assurent que les pathogènes n'échappent pas à la détection par l'immunité innée. L'activation des PRR par leurs ligands déclenche une cascade signalétique culminant vers la production de médiateurs inflammatoires tels que les cytokines, les chimiokines et les IFN. Ces facteurs mobilisent les défenses de l'hôte en augmentant la perméabilité et l'expression séquentielle de molécules d'adhésion par l'endothélium vasculaire drainant le foyer infectieux, permettant le recrutement coordonné de cellules phagocytaires et de lymphocytes. Les signaux émanant de l'activation des PRR ne sont pas seulement critiques pour l'élimination des agents infectieux et la restauration de l'homéostasie tissulaire, ils façonnent aussi, plus tardivement, l'orientation de la défense immune adaptative (revue dans De Nardo, 2015; Newton & Dixit, 2012)

### **2.4.1- Les récepteurs Toll (TLR)**

Les TLR sont des protéines transmembranaires de type I constituées d'un domaine amino (N)-terminal extracellulaire responsable de la reconnaissance des motifs microbiens, une unique

région transmembranaire et un domaine cytoplasmique récepteur *Toll/IL-1* (TIR) carboxy (C)-terminal responsable de la signalisation intracellulaire. À l'heure actuelle, 10 TLR humains (TLR1-10) et 12 murins (TLR1-9 et 11-13) ont été identifiés (Fig. 4) (De Nardo, 2015). Ces TLR peuvent se subdiviser en deux classes selon 1) leur localisation dans la membrane plasmique et 2) leur localisation intracellulaire dans des compartiments endosomaux. Afin d'augmenter leur panel de ligands reconnaissables, certains TLR forment des hétérodimères ou s'associent à des protéines accessoires et des co-récepteurs (ex. CD14, CD36) (Stewart *et al.*, 2010). La liaison des TLR avec leurs ligands respectifs entraîne un changement conformationnel du domaine TIR et une stabilisation du complexe récepteur menant au recrutement de protéines adaptatrices cytosoliques qui initient la cascade de signalisation (Latz *et al.*, 2007; Tanji *et al.*, 2013). Cinq protéines adaptatrices ont été identifiées jusqu'à présent : MyD88, MAL (ou TIRAP), TRIF, TRAM et SRAM (O'Neill & Bowie, 2007). À l'exception de SRAM qui agit comme un régulateur négatif, ces adaptateurs déclenchent deux voies principales dépendantes de MyD88 ou de TRIF qui conduisent principalement, mais non exclusivement, à la production de cytokines inflammatoires ou d'IFN de type I respectivement (Carty *et al.*, 2006; revue dans De Nardo, 2015).





#### Figure 4. Voies de signalisation associées aux TLR

Les TLR5, TLR11, TLR4, et les hétérodimères TLR2–TLR1 ou TLR2–TLR6 lient leurs ligands respectifs à la surface cellulaire alors que les TLR3, TLR7–TLR8, TLR9 et TLR13, localisés dans les endosomes, détectent la présence d’acides nucléiques microbiens. Le TLR4 se localise à la fois dans la membrane plasmique et les endosomes. La signalisation par les TLR est initiée par la liaison du ligand et la dimérisation des récepteurs. Suivant l’interaction avec des protéines adaptatrices (MyD88, TRIF, MAL, TRAM) qui recrutent et stimulent d’autres protéines de signalisation, plusieurs facteurs de transcription sont activés et induisent la production de cytokines inflammatoires et/ou d’IFN de type I (O’Neill *et al.*, 2013).

##### 2.4.1.1- Les TLR de surface

Les TLR de surface (TLR-1, -2, -4, -5, -6, -11 et -12) sont localisés dans la membrane plasmique et peuvent former des homodimères (TLR5, TLR11) ou des hétérodimères (TLR2 avec TLR1 ou TLR6; TLR4 avec CD14 ou CD36) (Fig. 4). Les couples TLR2/1, TLR2/6 et TLR4/CD14 sont responsables de la reconnaissance de structures bactériennes lipidiques

(lipoprotéines triacétylées, diacétylées et LPS respectivement) alors que les homodimères TLR5 et TLR11 reconnaissent des protéines bactériennes (flagelline et/ou prophiline) (O'Neill *et al.*, 2013). Le rôle du TLR12 est peu connu mais une étude récente a montré que son association avec le TLR11 était indispensable à la reconnaissance de la prophiline (Andrade *et al.*, 2013). L'engagement des TLR membranaires avec leur ligand respectif entraîne leur dimérisation et un changement conformationnel favorable au recrutement de la protéine adaptatrice MyD88, qui interagit via son domaine C-terminal directement avec le domaine TIR du récepteur, ou dans le cas des TLR2 et TLR4, en se combinant avec la protéine MAL (Fitzgerald *et al.*, 2001). Une fois associée au récepteur, le domaine de mort N-terminal de MyD88 interagit séquentiellement avec un ensemble de protéines sérine-thréonine kinase du cytosol (IRAK4 d'abord puis IRAK2 et IRAK1 ensuite) qui s'activent mutuellement pour former le complexe Myddosome (Gay *et al.*, 2011). L'activation des IRAK incite ensuite au recrutement transitoire de TRAF6 au Myddosome, son activation subséquente puis son relâchement dans le cytosol où il forme un complexe avec TAK1, TAB1 et TAB2/3 (Qian *et al.*, 2001). Ce regroupement est essentiel à l'activation du complexe IKK (IKK $\alpha/\beta$ ) qui permettra alors la libération puis la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Napetschnig & Wu, 2013). En parallèle, TAK1 déclenche aussi la voie des MAP kinase (p38 et JNK) médiant l'activation des facteurs de transcription AP-1 et CREB (revue dans De Nardo, 2015; Shim *et al.*, 2005). La mobilisation de ces trois facteurs de transcription vers le noyau initie finalement la transcription des gènes de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires tels que des cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ , PGE2), des chimiokines (CCL2, CXCL1, CXCL10) et des molécules d'adhésion (ICAM-1 et VCAM-1) favorisant le recrutement et l'activation des leucocytes inflammatoires (Das *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008; Newton & Dixit, 2012; Yang & Seki, 2012).

À la différence des autres TLR de surface qui n'activent que la voie dépendante de MyD88, le TLR4 peut aussi déclencher la voie dépendante de TRIF suivant sa translocation dans des compartiments endosomaux, permise par le co-récepteur CD14 (Zanoni *et al.*, 2011). L'interaction avec TRIF nécessiterait cependant l'association préalable du TLR4 avec la protéine adaptatrice TRAM dans l'endosome (Yamamoto *et al.*, 2003). Subséquemment à son

activation, TRIF peut se complexer avec le facteur TRAF3, qui active séquentiellement TBK/IKK $\epsilon$  et le facteur de transcription IRF-3 pour l'induction d'IFN- $\beta$ , ou interagir avec le facteur TRAF6 via la kinase RIP1 menant à l'activation des voies NF- $\kappa$ B et MAPK et la production de cytokines inflammatoires (Gohda *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2003). Un mécanisme similaire d'internalisation du TLR2 dans des compartiments endosomaux et menant à la production d'IFN $\beta$  a aussi été suggéré mais, contrairement au TLR4, la signalisation serait dépendante de MyD88 et de l'activation des facteurs de transcription IRF-1 et -7 (Barbalat *et al.*, 2009; Dietrich *et al.*, 2010).

Quoique les TLR de surface soient spécialisés dans la reconnaissance de ligands bactériens, les TLR2 et TLR4 affichent aussi une affinité pour certains ligands viraux. À cet effet, il a été rapporté que les protéines « core » et NS3 du HCV interagissaient avec le TLR2 à la surface des monocytes et activaient les voies MAPK p38, JNK et AP-1 (Dolganiuc *et al.*, 2004). Certains coronavirus (CoV) semblent aussi interagir avec le TLR2. De fait, la liaison de la protéine S du SARS-CoV humain et du virus de l'hépatite murine MHV3 au TLR2 induit la sécrétion de plusieurs cytokines inflammatoires dont l'IL-6 par des PBMC ou des macrophages péritonéaux (Dosch *et al.*, 2009; Jacques *et al.*, 2009b). Les protéines de surface de virus neurotropes tels que le HSV-1 et le virus de la rougeole ont aussi été rapportées pour se fixer et induire la signalisation via le TLR4 et/ou TLR2 (Bieback *et al.*, 2002; Kurt-Jones *et al.*, 2004; Villalba *et al.*, 2012).

#### **2.4.1.2- Les TLR endosomaux**

Alors que les TLR membranaires reconnaissent des ligands exprimés à la surface microbienne, les TLR endosomaux se spécialisent dans la reconnaissance des divers types d'acides nucléiques microbiens. La compartimentalisation intravésiculaire de ces TLRs serait importante pour prévenir des réponses autoimmunes contre les acides nucléiques de l'hôte (Barton & Kagan, 2009). Le TLR3 et les TLR7/8 sont responsables respectivement de la détection des ARN viraux double brin et simple brin, alors que le TLR13 reconnaît l'ARN ribosomal 23S bactérien. Le TLR9, quant à lui, détecte les motifs CpG non méthylés de

l'ADN des génomes bactériens et viraux (Fig. 4) (O'Neill *et al.*, 2013). À l'instar des TLR de surface, l'engagement des TLR7, 8, 9 et 13 déclenche une signalisation dépendante de MyD88 menant à la formation du Myddosome, l'activation de TRAF6 et l'induction subséquente des voies NF- $\kappa$ B et MAPK pour la production de cytokines inflammatoires. Cependant, ces TLR recrutent aussi en parallèle le facteur TRAF3 qui favorise, via l'activation du facteur de transcription IRF-7, la production des IFN de type I (IFN $\alpha/\beta$ ) spécialisés dans la défense antivirale. La signalisation induite par le TLR3 est similaire à celle initiée par le TLR4 endocyté qui dépend plutôt de TRIF (Newton & Dixit, 2012).

Les TLR endosomaux sont impliqués dans l'initiation des défenses innées contre plusieurs types de virus à ARN et à ADN. Notamment, il a été rapporté que la reconnaissance du HCV par les TLR3 et TLR7 menait à la production de plusieurs cytokines et chimiokines dont l'IL-6, le CXCL10 et le MIP-1a, et d'IFN $\alpha/\beta$  (Li *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2010). De plus, des études ont démontré que la stimulation des TLR3, TLR7 et TLR9 par des ligands synthétiques interférait avec la réplication des HBV et HCV (Isogawa *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2007).

#### **2.4.2- Les récepteurs de type hélicase (RLR)**

Les cellules de l'immunité innée possèdent aussi des senseurs viraux localisés dans le cytosol et activés suite à l'entrée des virus et/ou lors de leur réplication. Les mieux documentés sont les récepteurs RIG-I (retinoic-acid-inducible protein 1) et MDA-5 (melanoma-differentiation-associated gene 5) qui signalent la présence d'ARN double brin (db), constituant le génome des virus de la famille des *Reoviridae* et un stade intermédiaire de la réplication de tous les virus à génome ARN (revue dans Gack, 2014). RIG-1 serait spécifiquement activé par la présence d'un groupement triphosphate situé en 5' des petits ARNdb alors que MDA-5 lierait préférentiellement les longs ARNdb (plus de 2Kb) mais le ligand spécifique reste à déterminer (Kato *et al.*, 2008; Pichlmair *et al.*, 2006). Les deux senseurs, caractérisés par un domaine ARN hélicase DExD/H box interagissant avec l'ARN viral, et deux domaines CARD (caspase recruiting domain) requis pour la transmission du signal (Loo & Gale, 2011), partagent des caractéristiques signalétiques similaires. Suivant la reconnaissance d'ARNdb, les RIG-I et

MDA-5 sont recrutés par l'adaptateur IPS-1 à la membrane externe mitochondriale d'où ils activent les facteurs de transcription IRF3, IRF7 et NF- $\kappa$ B. Les IRF3 et IRF7 contrôlent l'expression des IFN de type I (IFN $\alpha/\beta$ ) alors que le NF- $\kappa$ B régule la production de cytokines pro-inflammatoires (Kawai *et al.*, 2005; Saha *et al.*, 2006; Sasai *et al.*, 2006).

Le rôle de ces récepteurs cytosoliques pour l'ARNdb serait plus important que leur équivalent endosomal TLR3 dans la défense innée antivirale médiée par les cellules dendritiques et les macrophages (Kato *et al.*, 2005). De fait, l'activation de RIG-I confère une résistance à plusieurs virus à génome ARN négatif incluant les orthomyxovirus, rhabdovirus, bunyavirus et paramyxovirus ainsi que le virus HCV possédant un génome ARN positif alors que MDA-5 interfère avec la réplication de certains membres de la famille des *Picornaviridae* et *Caliciviridae* (revue dans Gack, 2014). Plusieurs virus comme le virus de la dengue, le WNV, les réovirus, certains paramyxovirus (ex. virus de la rougeole) et des CoV (MHV) peuvent être reconnus par les deux types de senseurs (Li *et al.*, 2010; revue dans Gack, 2014). Cette double détection interviendrait possiblement à des temps différents lors du cycle répliatif puisqu'il a été récemment montré que les divers sous-produits d'ARN générés lors de la réplication virale du WNV pouvaient être distinctivement et séquentiellement détectés par RIG-I et MDA-5 (Errett *et al.*, 2013).

#### **2.4.3- Les alarmines**

L'immunité innée n'est pas que déclenchée par la détection de motifs moléculaires microbiens par les PRR. Des molécules endogènes, libérées lors de dommages cellulaires, peuvent rapidement alerter les cellules de l'immunité innée et agir en synergie dans l'induction d'une réponse inflammatoire (Oppenheim & Yang, 2005). Ces médiateurs endogènes, nommés alarmines, sont relâchés précocement lors du processus de nécrose cellulaire et signalent la présence d'un danger en se liant à leur récepteur spécifique et/ou à des TLR de surface exprimés par les cellules de l'immunité innée. Elles activent alors les voies dépendantes de MyD88 (NF- $\kappa$ B et MAPK) menant à la production rapide de cytokines pro-inflammatoires. Les médiateurs connus pour agir comme alarmines incluent notamment les protéines de choc

thermique, la protéine HMGB1 (high-mobility group box-1) et plus récemment l'IL-33. (Harris & Raucci, 2006; Arshad *et al.*, 2012). Parmi celles-ci, l'IL-33 semble jouer un rôle important dans la réponse inflammatoire hépatique précoce. Exprimée fortement et constitutivement par les cellules endothéliales des sinusoides, l'IL-33 est rapidement libérée en réponse à des atteintes de l'endothélium (Moussion *et al.*, 2008). Une expression élevée d'IL-33 par les LSEC a d'ailleurs été rapportée dans le modèle expérimental d'hépatite aiguë induite par la ConA (Arshad *et al.*, 2011) et chez des patients infectés chroniquement par les virus HCV et HBV (Marvie *et al.*, 2010). Cependant, les effets de la libération précoce d'IL-33 par les LSEC sur la pathogénèse ne sont pas clairement établis. Certaines études ont rapporté que l'interaction de l'IL-33 avec les cellules cibles exprimant le récepteur ST2L (NK, NKT, DC, éosinophiles) augmentait l'expression des TLR et favorisait l'adhésion, la dégranulation, la chimiotaxie et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1), facilitant ainsi les défenses innées (Liew *et al.*, 2010; Miyake, 2007; Murphy *et al.*, 2010). Dans ce sens, il a été montré que l'IL-33 pouvait agir en synergie dans l'induction de cytokines dépendantes de l'activation du TLR2 (Espinassous *et al.*, 2009). Cependant, d'autres travaux ont plutôt rapporté un effet modulateur de l'IL-33 sur la réponse inflammatoire par sa capacité à recruter des lymphocytes Treg (Volarevic *et al.*, 2012). Des effets aggravants supportés par une corrélation entre les niveaux d'IL-33 et la nécroptose hépatocytaire induite lors d'hépatite par la ConA ont aussi été suggérés (Arshad *et al.*, 2015).

## **2.5- Les coronavirus (CoV)**

### **2.5.1- Historique et classification**

Le premier CoV humain, nommé B814, fut isolé en 1965 par Tyrell et Bynoe suite à un prélèvement de sécrétions trachéales d'un patient présentant des symptômes de rhume (Tyrell & Bynoe, 1966). La présence du nouvel agent infectieux avait été confirmée en inoculant par voie intranasale des sujets volontaires qui développaient les mêmes symptômes. Au courant de la même année et de la suivante, des virus provoquant des symptômes apparentés furent isolés par la même équipe et d'autres pour finalement être caractérisés en microscopie électronique

(Almeida & Tyrrell, 1967; Hamre & Procknow, 1966). À l'observation, tous les virus présentaient une structure similaire qui s'apparentait à celle de virus animaux isolés durant la même période, tels que les virus de la bronchite aviaire (IBV) et de l'hépatite murine (MHV) (McIntosh *et al.*, 1967a et b). En raison des projections de la glycoprotéine de surface qui leur conférait un aspect de couronne, le nom « coronavirus » fut proposé puis finalement officialisé comme nouveau genre en 1975 (Tyrrell *et al.*, 1975). Aujourd'hui, les CoV sont classés dans la famille des *Coronaviridae*, elle-même incluse dans l'ordre des *Nidovirales*, et se subdivisent en quatre genres  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  (de Groot *et al.*, 2013). Des prototypes de chaque genre incluent les CoV humains NL63 et 229E et porcine TGEV pour les  $\alpha$ -CoV, les virus de l'hépatite murine (MHV) et le SARS-CoV pour les  $\beta$ -CoV, le virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) ( $\gamma$ -CoV) et le CoV aviaire bulbul ( $\delta$ -CoV) (Reguera *et al.*, 2014).

### **2.5.2- Pathologies causées par les CoV**

Les CoV infectent plusieurs types d'espèces aviaires et de mammifères, incluant l'homme. La plupart des CoV se répliquent en premier lieu dans les cellules épithéliales du tractus digestif ou respiratoire, puis se disséminent dans l'organisme pour causer diverses pathologies. Les CoV animaux peuvent être responsables de gastroentérite, de péritonite, d'hépatite, de néphrite et d'encéphalite. En raison de la diversité d'espèces d'intérêt commercial qu'ils infectent (porcines, bovines, aviaires), ils sont souvent associés à des pertes économiques considérables (de Haan *et al.*, 2005; Berry *et al.*, 2015). Chez l'humain, les infections par CoV se traduisent essentiellement par des complications des voies respiratoires supérieures et occasionnellement des gastroentérites (Reguera *et al.*, 2014). Quatre CoV humains (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 et HCoV-HKU1) sont endémiques dans la population et sont associés à environ 30% des rhumes communs (Berry *et al.*, 2015; Reina *et al.*, 2014). Deux virus émergents d'origine zoonotique, le SARS-CoV et le MERS-CoV, sont la cause de syndromes respiratoires sévères aigus et représentent une menace significative pour la santé humaine. De fait, le SARS-CoV, découvert en Chine au courant de l'année 2002, et le MERS-CoV, isolé au moyen orient en 2012, ont été associés respectivement à des taux de mortalité de 10 et 36%, atteignant jusqu'à 50% chez certains groupes de la population (Drosten *et al.*, 2003; de Groot

*et al.*, 2013; Gralinski & Baric, 2015). Des évidences ont montré que suivant une réplication primaire dans les voies respiratoires, les coronavirus humains HCoV-229E et -OC43 ainsi que le SARS-CoV pouvaient migrer vers le SNC, ceux-ci ayant été retrouvés dans le cerveau de patients atteints de la sclérose en plaque et du syndrome respiratoire sévère aigu respectivement (Murray *et al.*, 1992; Stewart *et al.*, 1992; Gu *et al.*, 2005). Ces découvertes suggèrent donc un potentiel neuroinvasif pour les CoV humains. D'ailleurs, les virus HCoV-229E et -OC43 ont déjà été proposés comme agents étiologiques potentiels de la sclérose en plaque (Arbour *et al.*, 2000). Les mécanismes à l'origine de la neuroinvasion par les CoV et ses conséquences sur la pathogénèse ne sont cependant pas encore clairement élucidés.

Quoique les CoV démontrent normalement un tropisme réservé à des espèces uniques ou étroitement apparentées, certains peuvent occasionnellement surpasser la barrière d'espèce, comme par exemple lors d'infection du dindon par le CoV bovin (BCoV), ou encore de l'infection expérimentale du chien par le TGEV porcine (Decaro *et al.*, 2009; Hasoksuz *et al.*, 2005). L'émergence récente du SARS-CoV et du MERS-CoV, résultant d'une transmission zoonotique, est un bel exemple du potentiel de transmission inter-espèce des CoV. Il a été démontré que le SRAS-CoV et MERS-CoV étaient étroitement apparentés au bat-SARS-CoVs dont l'hôte naturel, un chiroptère (chauve-souris), serait possiblement le réservoir animal primaire (Lau *et al.*, 2005; Zaki *et al.*, 2012). Depuis, l'identification et l'analyse génétique d'une vaste diversité de CoV isolés de chiroptères suggèrent que la majorité sinon tous les CoV de mammifères dériveraient de leur homologue bat-SARS-CoV (Li *et al.*, 2005). Cette faculté d'adaptation à de nouveaux hôtes serait en partie tributaire du taux importants de recombinaisons génétiques chez les CoV et de l'infidélité de leur ARN polymérase générant plusieurs quasi-espèces (Denison *et al.*, 2011). Ces sauts inter-espèces responsables d'éruptions zoonotiques, combinés à la diversité des réservoirs animaux et des pathologies qu'ils causent font des CoV un risque potentiel pour la santé humaine et traduisent l'importance d'approfondir les connaissances associées à leurs mécanismes pathogéniques.



### 2.5.3- Structure des CoV

Les CoV sont des particules sphériques de taille variant entre 120 et 160 nm caractérisés par un génome ARN simple brin (ARNsb) de polarité positive et une nucléocapside de symétrie hélicoïdale enveloppée d'une membrane lipidique (Li *et al.*, 2006). Leur génome important, de longueur variant entre 27 et 32 Kb, en font les plus gros virus ARN connus (Li, 2015). L'enveloppe virale renferme plusieurs protéines structurales : la glycoprotéine de surface (S), la protéine d'enveloppe (E), la glycoprotéine membranaire (M), et chez certains sérotypes l'hémagglutinine estérase (HE) (Fig. 5A). Bien qu'elle dérive de la membrane des cellules hôtes, l'enveloppe virale est toutefois plus épaisse qu'une membrane type en raison de la région C-terminale de la protéine M qui forme une seconde couche interne telle que révélée par tomographie cryo-électronique (Perlman & Netland, 2009). Le cœur de la particule est composé de l'ARN génomique encapsidé par les nucléoprotéines (N) pour former la nucléocapside hélicoïdale. Le ratio des protéines S:E:M:N dans les virions varie selon les différents coronavirus.

La protéine S est une glycoprotéine transmembranaire de type 1 de taille imposante, comprenant entre 1160 et 1452 acides aminés, qui s'assemble en trimères à la surface virale pour former les spicules caractéristiques des CoV. Cette protéine, synthétisée sous forme de précurseur, subit un clivage post-traductionnel par des protéases cellulaires lors du cycle de réplication en deux domaines S1 N-terminal et S2 C-terminal. Une distinction importante entre les CoV est qu'ils arborent à leur surface une protéine S déjà clivée ou non, selon l'étape à laquelle a lieu le clivage durant la réplication virale. En effet, le clivage peut avoir lieu lors de l'assemblage et l'exocytose des virions ou encore seulement suite à la fixation au récepteur de la cellule cible. Le domaine S1, dont la séquence présente des régions hypervariables, est responsable de l'attachement aux cellules cibles alors que le domaine S2, qui présente une séquence hydrophobe hautement conservée, est impliqué dans la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule hôte pour l'entrée virale (Belouzard *et al.*, 2012). En conséquence, la protéine S détermine le tropisme et la virulence des CoV et est la cible des anticorps neutralisants. D'ailleurs, l'immunisation avec la protéine S seule peut induire une protection intraspécifique et parfois interspécifique (Enjuanes *et al.*, 2006). Cependant, comme

la plupart des protéines de surface, ses régions hypervariables lui permettent d'échapper à la pression immunitaire, et, le cas échéant, d'élargir son tropisme cellulaire (Vabret *et al.*, 2009).

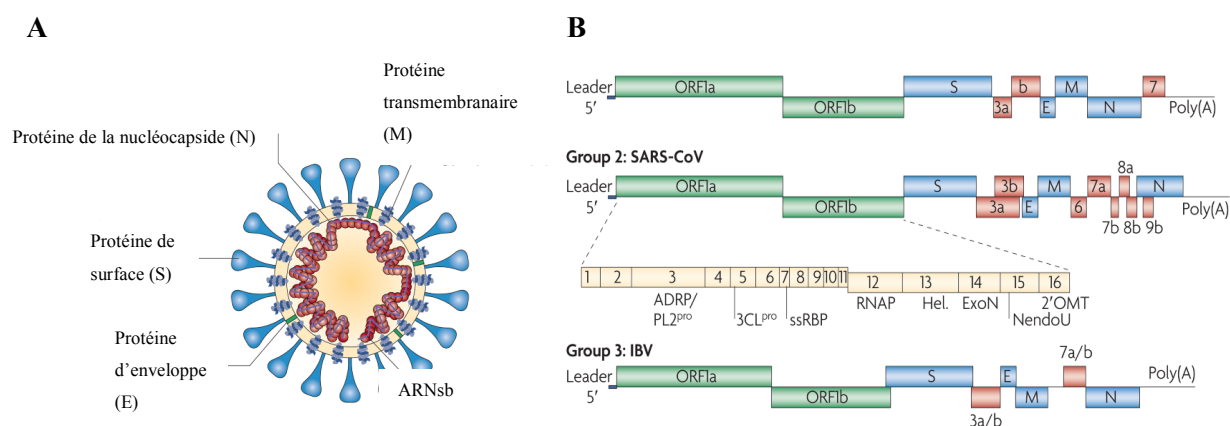
La protéine N est une phosphoprotéine hautement basique qui module la synthèse d'ARN viral et s'y fixe pour former une nucléocapside en hélice (Enjuanes *et al.*, 2006). Elle agit également comme un antagoniste des IFN de type I (Perlman & Netland, 2009) et régule à la hausse la production de la prothrombinase fgl2, un facteur contribuant à l'hépatite murine fatale induite par le sérotype MHV-3 (Qin Ning *et al.*, 2003).

La protéine M est la plus abondante des protéines de l'enveloppe virale. Elle participe, en collaboration avec la protéine E, à l'assemblage des virions et induit la production d'IFN $\alpha$  par la cellule hôte (Enjuanes *et al.*, 2006). La protéine E semblerait jouer un rôle essentiel (TGEV) ou partiel (SARS-CoV et MHV) dans le bourgeonnement des virions. Elle agirait aussi comme un canal ionique, qui par un mécanisme inconnu, optimiserait la réplication virale (Kuo & Masters, 2003; Wilson *et al.*, 2006; DeDiego *et al.*, 2007; Ortego *et al.*, 2007).

Chez quelques  $\beta$ -CoV, la protéine HE forme de petites projections de surface supplémentaires. Apparemment non-essentielle à la réplication, cette protéine possède un domaine de fixation pour l'acide 9-O-neuraminique-acétylé et une activité hémagglutinante. Elle pourrait être impliquée dans l'entrée ou la sortie des virions via des interactions avec l'acide sialique à la surface cellulaire et serait importante pour l'infection de l'hôte naturel (Lissenberg *et al.*, 2005). La HE des CoV présente une homologie de séquence importante avec la protéine HA de l'influenza type C, suggérant une recombinaison antérieure lors d'une co-infection (Enjuanes *et al.*, 2006).

L'ARN génomique, polyadénylé en 3' et coiffé en 5', consiste en un simple brin linéaire comprenant 6 à 11 cadres de lecture ouverts (ORF) (Fig. 5B) flanqué de deux séquences non traduites (UTR) de 200 à 600 pb à chaque extrémité. Le premier ORF (1a/b) s'étend sur environ deux-tiers du génome et encode 15 à 16 protéines non-structurales (nsp) regroupées en un complexe transcriptase-réplisase viral qui inclut l'ARN polymérase ARN dépendante (nsp12), une protéase (nsp3), une primase (nsp8) et une hélicase (nsp13) (Fig. 5B). Les nsp 7-

10 sont présumées jouer un rôle dans la synthèse des ARN génomiques et/ou sous-génomiques. Les régions 1a et 1b de l'ORF1 se chevauchent de quelques nucléotides par une séquence glissante spécifique et une structure en pseudo noeud (signal de décalage du cadre de lecture ribosomal) nécessaires à la traduction de l'ORF1b. Le dernier tiers du génome contient les gènes codant pour les protéines structurales, toujours disposés selon la séquence : (HE)-S-E-M-N (Fig. 5B). Un nombre variable d'ORFs (1 à 8) codant pour des protéines accessoires nsp sont intercalés entre ces gènes (Enjuanes *et al.*, 2006; Perlman & Netland, 2009). Ces protéines accessoires « niches-spécifiques » seraient non essentielles à la réplication virale *in vitro* mais constitueraient des éléments clés dans la réplication lors d'infections naturelles (King *et al.*, 2012)



### Figure 5. Organisation génomique et structurale des CoV

**A)** Le génome ARNs<sub>b</sub> est imbriqué dans une nucléocapside (N) hélicoïdale recouverte d'une enveloppe lipidique dérivée de la cellule hôte. L'enveloppe comprend au moins trois protéines structurales : la protéine de surface (S), qui détermine le tropisme par l'attachement aux cellules hôtes, et les protéines d'enveloppe (E) et transmembranaire (M) impliquées dans l'assemblage des virions. Certains coronavirus (ex. MHV-A59) expriment une protéine supplémentaire, l'hémagglutinine estérase (HE, non représentée) **B)** Représentation schématique d'un génome représentatif de chaque groupe de CoV. Le premier 2/3 du génome ARNs<sub>b</sub> encode une polyprotéine (ORF1a/b) qui subit un clivage protéolytique pour générer 15 ou 16 protéines non structurales (nsp). Le dernier 1/3 du génome encode les protéines structurales S-E-M-N et parfois HE (non représentée) et un nombre variable de nsp accessoires (Perlman & Netland, 2009).

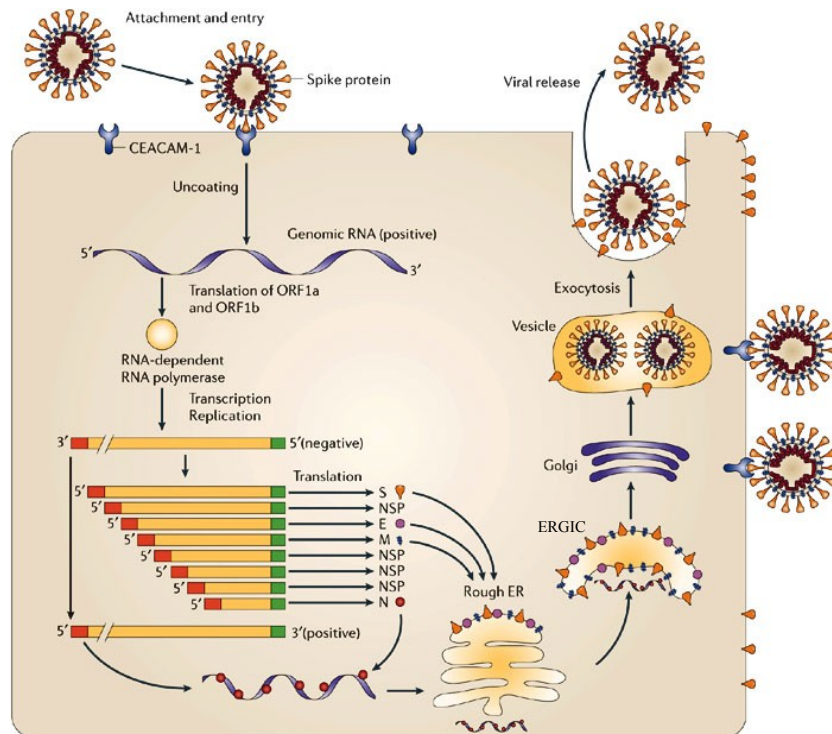
#### 2.5.4- Réplication des CoV

La réplication des CoV est schématisée à la figure 6. La première étape de la réplication virale consiste en l'attachement du virus à la cellule cible. Bien que les CoV puissent interagir via les résidus glycosylés de leur protéine S avec plusieurs molécules de surface (lectines de type C (ex.DC-SIGN), heparane sulfate, acides sialiques), une fixation plus spécifique entre la protéine S et le récepteur cellulaire est requise pour l'établissement d'une infection virale productive (Belouzard *et al.*, 2012; Jacques *et al.*, 2009b). Ces récepteurs varient pour les différents CoV. Par exemple, le prototype murin MHV se fixe à la molécule CEACAM1a, un membre de la famille des antigènes carcinoembryonnaires murins (Hemmila *et al.*, 2004) alors que plusieurs  $\alpha$ -CoV se lient à l'aminopeptidase N (Weiss & Navas-Martin, 2005). Les virus SARS-CoV et CoV-NL63 entrent dans les cellules hôtes en interagissant avec l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) (Lau *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007) alors que le MERS-CoV se fixe au récepteur récemment identifié CD26 (ou dipeptidyl peptidase 4, DPP4) (Lu *et al.*, 2013).

L'attachement au récepteur induit un changement conformationnel de la protéine S, exposant le peptide de fusion du domaine S2 nécessaire à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule hôte pour l'entrée virale. Ce changement de conformation et la fusion subséquente peuvent être initiés directement par la liaison au récepteur ou nécessiter une acidification ou activation protéolytique additionnelle. Selon le mécanisme préconisé, qui varie selon les CoV, la fusion a lieu à la surface de la cellule hôte avec la membrane plasmique ou encore au niveau de la membrane d'une vésicule endosomale acidifiée suite à l'internalisation de la particule (Belouzard *et al.*, 2012). Dans tous les cas, l'ARN génomique est relargué dans le cytoplasme et pris en charge par les ribosomes cellulaires pour sa traduction. Celle-ci débute d'abord sur l'ORF1a puis s'étend ensuite à l'ORF1b, suite à un signal de décalage -1 du cadre de lecture ribosomal, pour générer deux polypeptides communément appelés pp1a et pp1ab, qui subiront des clivages protéolytiques par des protéases virales afin de générer le complexe réplicase-transcriptase viral (Perlman & Netland, 2009). Ce complexe serait ensuite intégré dans la membrane de vésicules cellulaires à double membrane, probablement issues du réticulum endoplasmique (ER), dans lesquelles se

déroulerait la synthèse *de novo* de l'ARN viral (Hagemeijer *et al.*, 2012). Certaines études ont aussi suggéré que ces vésicules originent de la machinerie autophagique cellulaire étant donné leurs caractéristiques ultrastructurales similaires à celles des autophagosomes, (Prentice *et al.*, 2004a et b). Présente dans le complexe réplicase-transcriptase, l'ARN polymérase ARN-dépendante transcrit d'abord l'ARN génomique en un ARNsb antisens (polarité négative). Ce dernier sert dès lors de matrice pour la synthèse de nouveaux ARNsb génomiques de polarité positive destinés aux virions en formation mais également pour la transcription discontinue d'un ensemble d'ARN sous-génomiques de polarité positive, qui traduits, engendreront les protéines structurales (HE)-S-E-M-N et les nsp accessoires nécessaires à l'assemblage des virions (Denison *et al.*, 2011). Ces ARN sous-génomiques, excepté le plus petit, sont polycistroniques (contenant au minimum deux ORF), mais seul l'ORF en 5' terminal est généralement traduit (Enjuanes *et al.*, 2006). La protéine N nouvellement formée interagit rapidement avec l'ARN génomique pour augmenter davantage sa transcription et sa traduction (Compton *et al.*, 1987; Tahara *et al.*, 1998).

Les nouveaux ARN génomiques produits se dimérisent ensuite avec la protéine N pour former la nucléocapside qui est ensuite incorporée dans les vésicules des compartiments intermédiaires ER-Golgi (ERGIC) dans lesquelles sont enchâssées les protéines structurales E, M et S nouvellement synthétisées (Ujike & Taguchi, 2015). La protéine M semble essentielle à l'incorporation des protéines E et S dans les virions en formation. Elle dirige également l'encapsulation des particules via son domaine C-terminal qui interagit par des liaisons ioniques avec la protéine N et l'ARN génomique de la nucléocapside (McBride *et al.*, 2014). Les domaines C-terminaux des protéines E et M interagissent ensuite pour l'assemblage final des virions (Corse & Machamer, 2003). Les protéines E s'insèrent dans le réseau de protéines M (Fischer *et al.*, 1998) et induisent la flexion de l'enveloppe (Raamsman *et al.*, 2000). Elles sont également essentielles pour la scission des particules sur le site de bourgeonnement (Vennema *et al.*, 1996). Les ERGIC fusionnent finalement avec le complexe golgien où les virions sont incorporés dans des vésicules de sécrétion destinées à la membrane plasmique pour l'exocytose (Ujike & Taguchi, 2015).



### Figure 6. Réplication des CoV

Le virus se fixe d'abord à la cellule hôte par une interaction entre sa protéine S et le récepteur cellulaire. L'entrée virale peut avoir lieu à la surface de la cellule ou à l'intérieur de vésicules endosomales suite, respectivement, à une fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique ou de la vésicule. L'ARNsb génomique de polarité positive est relargué dans le cytoplasme et traduit par les ribosomes cellulaires pour générer les protéines du complexe viral Réplicase-Transcriptase. La transcription de l'ARN génomique par l'ARN polymérase génère un brin antisens de polarité négative qui servira de matrice pour la synthèse de nouveaux ARNs génomiques et d'un ensemble d'ARNs sous-génomiques qui seront traduits pour la synthèse des protéines structurales (S,E,M,N) et d'un nombre variable de protéines non structurales (nsp). L'assemblage des virions se déroule dans les vésicules des compartiments intermédiaires (ERGIC) situées entre le réticulum endoplasmique (ER) et le Golgi puis les particules virales sont finalement acheminées vers la membrane plasmique pour l'exocytose (Bergmann *et al.*, 2006).

### 2.6- Les virus de l'hépatite murine (MHV)

Les MHV, appartenant au genre  $\beta$ -CoV, sont des pathogènes naturels chez la souris. Ils se présentent sous forme de particules sphériques d'une taille d'environ 120 nm avec les projections de surface caractéristiques des coronavirus. Leur génome ARN d'une longueur d'environ 31 kb est imbriqué dans une nucléocapside hélicoïdale recouverte d'une enveloppe

lipidique dans laquelle sont enchâssées les protéines S, M et E typiques des CoV. Certains sérotypes MHV disposent de projections de surface supplémentaires, les dimères d'hémagglutinine estérase (HE) (Phillips & Weiss, 2011). Selon les sérotypes, les MHV établissent des infections primaires au niveau du tractus gastro-intestinal et du foie ou au niveau des voies respiratoires supérieures (Guénet, 2005; Bergmann *et al.*, 2006) et peuvent ensuite se disséminer ou non à d'autres organes. De par la diversité de pathologies qu'ils provoquent, les MHV constituent d'excellents modèles d'études animales pour les infections virales humaines.

### 2.6.1- Sérotypes et pathologies

Il existe plusieurs sérotypes de MHV qui se distinguent essentiellement par leur tropisme et leur niveau de virulence. Les MHV peuvent être responsables d'infections entériques, respiratoires, hépatiques et du SNC (Williams *et al.*, 1990). La sévérité et le type de pathologies induites par les MHV dépendent de plusieurs facteurs dont le sérotype, la voie d'inoculation (intracérébrale, intranasale, intrapéritonéale), l'âge et la génétique de l'hôte ainsi que de la réponse immune vis-à-vis l'infection (Lane & Hosking, 2010). Certains sérotypes se caractérisent par un tropisme plus marqué pour un organe en particulier. Par exemple, les sérotypes MHV-D, -Y, -RI, -S/CDC, LIVIM, et DVIM sont reconnus pour induire des gastroentérites, alors que le MHV1 provoque une pathologie qui s'apparente au syndrome respiratoire sévère aigu et constitue un modèle privilégié pour l'étude de la pathogénèse du SARS-CoV (Homburger *et al.*, 1998; De Albuquerque *et al.*, 2006). D'autres, comme le sérotype fortement neurotrope MHV-JHM et le sérotype hépatotrope MHV2, occasionnent principalement des encéphalites et des hépatites virales respectivement (Gallagher *et al.*, 1990; Navas *et al.*, 2001). Certains sérotypes affichent un tropisme moins strict et présentent l'avantage de pouvoir induire, selon la voie d'inoculation et la susceptibilité de l'hôte, des hépatites ou des maladies neurologiques de sévérité variable. Par exemple, le sérotype MHV-A59 est reconnu pour induire une hépatite aiguë modérée, une encéphalite et une neuropathologie chronique démyélinisante. Le sérotype MHV3, le plus pathogène de tous les MHV, provoque plutôt une hépatite aiguë fulminante ou chronique et des désordres neurologiques persistants selon le profil génétique de l'hôte. Ces derniers sérotypes, par leur

tropisme moins défini, représentent donc des outils importants dans la compréhension des mécanismes viraux qui prédisposent à la dissémination de l'infection à plusieurs organes suivant une infection primaire localisée.

### 2.6.2- Le récepteur des MHV

Le premier récepteur des CoV identifié fut le récepteur des MHV en 1991 (Dveksler *et al.*, 1991). Il s'agit de la molécule d'adhésion carcinoembryonnaire CEACAM1 (Carcinoembryonic antigen-cell adhesion molecule), une protéine transmembranaire de type I hautement glycosylée et membre de la superfamille des immunoglobulines (Ig) (Taguchi & Hirai-Yuki, 2012). Outre son rôle comme récepteur viral, la CEACAM1 est une protéine multifonctionnelle impliquée entre autre dans l'adhésion intercellulaire, la signalisation cellulaire, la régulation de la prolifération cellulaire et de l'immunité innée et adaptative, et comme adhésine bactérienne (Markel *et al.*, 2004). L'ectodomaine de CEACAM1 contient généralement quatre domaines de type immunoglobuline soient les domaines N, A1, B et A2 et leur nombre dépend de l'épissage alternatif qui régule aussi la longueur et la composition du domaine cytoplasmique, soit court (10-12 acides aminés) ou long (71-73 acides aminés) (Taguchi & Hirai-Yuki, 2012). Chez l'humain, douze isoformes ont été identifiées, alors que chez la souris seulement quatre isoformes sont retrouvées. Des isoformes sécrétées sont aussi produites par épissage alternatif ou par clivage à la surface cellulaire (Terahara *et al.*, 2009). Il existe en outre deux formes alléliques du CEACAM1, soient CEACAM1a et CEACAM1b, qui peuvent toutes deux agir comme récepteur fonctionnel du MHV, quoique l'efficacité de liaison avec l'allèle CEACAM1a soit de beaucoup supérieure (300 fois) (Ohtsuka *et al.*, 1996). Cette différence d'affinité s'expliquerait par une variation de quelques 6 acides aminés contigus dans le site de liaison au MHV sur le domaine N-terminal entre les allèles CEACAM1a et b (Rao *et al.*, 1997). D'ailleurs, il a été démontré que l'expression différentielle de ces deux allèles était un facteur déterminant dans la susceptibilité des différentes lignées murines à l'infection par les MHVs, l'allèle CEACAM1a étant exprimé chez les souris hautement susceptibles C57Bl/6 et BALB/c et l'allèle CEACAM1b chez la souris plus résistante SJL (Ohtsuka & Taguchi, 1997).



Bien que la CEACAM1a soit considérée comme le seul récepteur pour les MHV, des évidences récentes pointent vers l'existence potentielle d'autres récepteurs. En effet, il a été montré que la neurovirulence du sérotype MHV-JHM était partiellement indépendante du CEACAM1a. *In vitro*, l'isolat MHV-4 du MHV-JHM requiert la CEACAM1a pour l'entrée virale mais *in vivo*, il démontre la capacité à se propager de neurones en neurones chez des souris dépourvues de CEACAM1a (CEACAM1a<sup>-/-</sup>), par un mécanisme de fusion cellulaire indépendante du récepteur (Miura *et al.*, 2008). Des récepteurs alternatifs, tels que les molécules CEACAM2 et PSG16 (pregnancy-specific glycoprotein 16) ont été proposés mais leur expression restreinte dans le SNC et/ou un domaine N-terminal tronqué minimisent leur importance (Phillips & Weiss, 2011). La propagation du MHV-4 par la fusion cellules/cellules en absence du récepteur semble corrélérer avec la longueur de la région hypervariable du domaine S1 de sa protéine S (Phillips *et al.*, 2001). Il a aussi été proposé que des changements conformationnels de la protéine S soient facilités par une association moins stable des domaines S1 et S2 suggérant un potentiel fusogène intrinsèque qui ne dépendrait pas d'une fixation préalable au récepteur (Krueger *et al.*, 2001).

L'infection *in vivo* par le MHV-A59 dépend strictement de la présence du récepteur CEACAM1a (Hemmila *et al.*, 2004), quoiqu'une infection persistante *in vitro* favorise l'émergence de virus exhibant un tropisme élargi (Schickli *et al.*, 1997). Le virus MHV/BHK quant à lui infecte les cellules par un mécanisme indépendant de CEACAM1a, qui dépendrait plutôt d'une liaison spécifique de sa protéine S à des héparanes sulfate (de Haan *et al.*, 2005). Cette propriété résulterait de l'acquisition exclusive par ce virus de deux sites de liaison aux héparanes sulfate sur sa protéine S (de Haan *et al.*, 2006).

### **2.6.3- Le tropisme cellulaire des MHV**

Le tropisme des MHV dépend généralement de l'expression différentielle du récepteur CEACAM1a dans les différents organes. La molécule CEACAM1a est fortement exprimée au niveau de l'intestin grêle, modérément au niveau de la rate, des poumons, des reins et du foie et faiblement dans le cerveau et les muscles (Godfraind *et al.*, 1995; Slobodskaya *et al.*, 2012).

Plus précisément, la présence du récepteur a été rapportée à la surface des cellules épithéliales, des EC, des hépatocytes (Godfraind *et al.*, 1995) et des cellules de l'immunité innée telles les neutrophiles (Kuroki *et al.*, 1992), les macrophages (Coutelier *et al.*, 1994), les DC (Kammerer *et al.*, 2001) et les cellules NK (Moller *et al.*, 1996; Lehoux *et al.*, 2004). Les lymphocytes B et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés, mais non les CD8<sup>+</sup>, expriment aussi la molécule CEACAM1a et sont des cibles à l'infection par les MHV (Coutelier *et al.*, 1994; Kammerer *et al.*, 1998; Nakajima *et al.*, 2002; Greicius *et al.*, 2003). Au niveau du SNC, seules la microglie et les BMEC expriment ce récepteur, des traces ayant toutefois été détectées à la surface des neurones (Godfraind *et al.*, 1997; Ramakrishna *et al.*, 2004; Phillips & Weiss, 2011).

Cependant, l'expression de la CEACAM1a ne semble pas être le seul facteur déterminant le tropisme des MHV. Récemment, Slobodskaya *et al.* (2012) n'ont observé aucune corrélation entre l'abondance d'expression de CEACAM1a dans certains organes et le tropisme du MHV-A59. D'autre part, certaines cellules du SNC, telles que les oligodendrocytes et les astrocytes, n'expriment pas la CEACAM1 mais sont néanmoins susceptibles à l'infection virale par certains sérotypes (Cowley & Weiss, 2010). Ainsi, des distinctions importantes dans le tropisme, le degré de virulence et les pathologies induites par les différents sérotypes MHV suggèrent l'implication d'autres facteurs cellulaires ou viraux indépendants du récepteur. La construction de MHV chimériques arborant des protéines S provenant de différents sérotypes a néanmoins permis de mettre en évidence l'importance de la protéine S dans la pathogenèse et le tropisme différentiels des MHV. Par exemple, il a été montré que l'introduction du gène codant pour la protéine S du MHV-JHM (neurotrophe) et du MHV2 (hépatotrophe) dans le génome du MHV-A59 augmentait sa neurovirulence et son hépatotropisme respectivement (Navas *et al.*, 2001; Navas & Weiss, 2003). Il est donc possible que la fixation différentielle de la protéine S à d'autres molécules présentes à la surface cellulaire module le tropisme et/ou la pathogénicité des sérotypes. À cet égard, il a été rapporté que la protéine S du MHV3 pouvait, à la différence de celle du MHV-A59, se fixer au TLR2 sur des macrophages et induire subséquemment la production d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  indépendamment de la liaison au récepteur CEACAM1a (Jacques *et al.*, 2009b; Zhou *et al.*, 2010). L'importance du TLR2 comme modulateur du tropisme et de la pathogenèse des MHV reste cependant à déterminer.

D'autre part, plusieurs variants du sérotype hépatotrope fortement pathogène MHV3, se différenciant par un tropisme cellulaire plus étroit, ont aussi été générés. Par exemple, le variant faiblement atténué 51.6-MHV3, sélectionné suite à une infection sur des cellules L2 en présence d'anticorps monoclonaux neutralisants (A51 et A37), se distingue du sérotype parental par une absence de tropisme pour les LSEC (Martin *et al.*, 1994). Cette différence spécifique se traduit par une hépatite aiguë moins sévère, des foyers nécrotiques moins extensifs et un retard dans la mort des souris comparativement à l'infection par le MHV3 (Lamontagne *et al.*, 1994). Similairement, le variant non pathogène YAC-MHV3, généré suite à une infection persistante par le MHV3 dans la lignée cellulaire lymphoïde YAC-1, démontre un faible taux répliatif dans les macrophages et induit une hépatite sub-clinique avec élimination du virus en moins de 14 jours (Lamontagne & Dupuy, 1984). Ces variants du MHV3, par leur niveau de virulence atténué, traduisent l'importance du tropisme dans la pathogénicité du MHV3 et constituent des outils viraux importants permettant de disséquer l'importance relative des cellules permissives à la réplication virale dans la pathogenèse induite par le MHV3.

#### **2.6.4- Mécanismes d'entrée des MHV**

Les mécanismes d'entrée des MHV sont variés et diffèrent selon les sérotypes et la nature de la cellule cible. Certains sérotypes préconisent la fusion avec la membrane plasmique, d'autres avec la membrane des compartiments endosomaux et quelques-uns peuvent utiliser les deux voies d'entrée. Par exemple, le sérotype JHM (MHV-4) fusionne à pH neutre avec la membrane plasmique mais des particules ont aussi été détectées dans des vésicules endosomales, suggérant la possibilité pour le JHM d'entrer autant par voie directe qu'endosomale (Nash & Buchmeier, 1997). Le choix du mécanisme d'entrée pourrait dépendre du type cellulaire. Dans tous les cas, la fusion requiert la liaison au récepteur, tel que démontré par l'incubation de la protéine S du JHM avec une forme soluble du récepteur CEACAM1a, qui induit des modifications de l'hydrophobicité du domaine S2 essentielles à la fusion (Sturman *et al.*, 1990; Matsuyama & Taguchi, 2002; Zelus *et al.*, 2003). Il semble que la capacité de la protéine S à fusionner à pH neutre repose sur les propriétés du peptide de

fusion. En effet, il a été rapporté que la nécessité d'un pH acide pour l'infection productive par un variant MHV-4 isolé de cellules infectés chroniquement était reliée à trois mutations ponctuelles dans les régions heptadiques répétées du domaine S2 (Gallagher *et al.*, 1991).

Les données concernant les mécanismes d'entrée du sérotype MHV-A59 semblent contradictoires. Qiu *et al.* (2006) ont d'abord rapporté que l'infection par le MHV-A59 était insensible aux agents lysosomotropiques évoquant que l'entrée soit strictement localisée à la membrane plasmique. Cependant, en combinant différentes approches d'infections et de microscopie, d'autres ont plutôt mis en évidence une sensibilité du MHV-A59 aux mêmes agents et une internalisation du virus dans des compartiments endosomaux suggérant qu'une acidification et possiblement un clivage protéolytique du peptide de fusion soient nécessaires pour l'infection (Eifart *et al.*, 2007). Par ailleurs, le mécanisme d'endocytose préconisé par le MHV-A59 serait clathrine-dépendant et cavéoline-indépendant (Burkard *et al.*, 2014). L'entrée du sérotype MHV-2 a aussi été caractérisée et dépend exclusivement d'une fusion membranaire dans des compartiments endosomaux rendue possible suite au clivage protéolytique de la protéine S par des protéases endosomales activées à pH acide (cathepsines B et L). À l'instar du MHV-A59, l'endocytose du MHV-2 dépend de la voie clathrine et non de la cavéoline. (Pu & Zhang, 2008).

### **2.6.5- Le virus de l'hépatite murine de type 3 (MHV3)**

Le MHV3 est considéré comme le sérotype le plus virulent parmi les MHV. À la fois hépatotrope, neurotrophe et lymphotrophe, le MHV3 constitue un modèle animal d'infection virale privilégié pour l'étude des mécanismes pathogéniques, d'immunodéficiences et d'évasion virale induits lors d'hépatite ou de neuropathogénèse virale (Jolicoeur & Lamontagne, 1994). Le type de pathologie causée par le MHV3, de même que son évolution, diffère selon le profil génétique et l'âge de l'hôte (Lamontagne & Dupuy, 1984). Chez les souris génétiquement susceptibles (BALB/c, C57Bl/6), l'infection par voie intrapéritonéale (i.p.) se traduit par une hépatite fulminante provoquant la mort de tous les animaux infectés en moins d'une semaine (Virelizier *et al.*, 1975). Les lignées murines semi-résistantes C3H et

SJL développent d'abord une hépatite aiguë modérée, à laquelle une partie des souris survivent (Le Prevost *et al.*, 1975), qui progresse ensuite vers une hépatite chronique et le développement d'une maladie neurologique chronique (Virelizier *et al.*, 1975; Tardieu *et al.*, 1986). Au contraire, les souris A/J présentent une résistance génétique à l'hépatite induite par le virus MHV3 (Lamontagne *et al.*, 1989a). Les différences de susceptibilité génétique des lignées murines à l'infection aiguë ou chronique par le MHV3 serait déterminée en partie par les allèles du complexe majeur d'histocompatibilité (H-2) de même que la présence et le type d'isoforme du récepteur viral spécifique CEACAM1 exprimé à la surface des cellules (Damy *et al.*, 1992; Oth *et al.*, 1991; Nédellec *et al.*, 1994).

#### **2.6.5.1- L'hépatite induite par le MHV3**

Contrairement aux autres MHV hépatotropes, tel que le MHV-A59 qui induit une hépatite aiguë modérée suivie par l'élimination rapide du virus dans le foie 8 à 10 jours post-infection (p.i.) (Godfraind et Coutelier, 1998), l'infection de souris susceptibles (C57Bl/6, BALB/c) avec le sérotype MHV3 mène à une hépatite aiguë mortelle dans les 3 à 5 jours p.i. (Le Prevost *et al.*, 1975). L'analyse histopathologique du foie révèle des lésions nécrotiques progressives et les dysfonctions hépatiques résultent de la présence de multiples foyers inflammatoires et d'une nécrose hépatocellulaire extensive dans les trois premiers jours de l'infection (Lamontagne *et al.*, 1989b). De fait, les hépatocytes représentent la principale cible virale mais les KC, les LSEC, les HSC et les cellules NK et NK-T sont aussi infectées (Martin *et al.*, 1994; Lehoux *et al.*, 2004; Jacques *et al.*, 2008). Puisque l'ARN et les antigènes viraux sont détectables dès 24h p.i. dans les KC et les LSEC (Pereira *et al.*, 1984; Décimo *et al.*, 1993), Martin *et al.* (1994) ont postulé que ces cellules pourraient constituer le site primaire de réplication du MHV3 dans le foie. En accord avec cette hypothèse, des perturbations précoces dans la microcirculation des sinusoides, caractérisées par un flux sanguin granulaire et la présence de microthrombi périportaux, sont observées dès 6 à 12h p.i (Levy *et al.*, 1983). Ces manifestations sont suivies, dès 24h p.i., par une réduction du nombre de fenestrations des LSEC (Steffan *et al.*, 1995) et une diminution importante de la vitesse des érythrocytes et du flux sanguin microvasculaire, secondaire à la présence de caillots d'érythrocytes, de plaquettes et de dépôts de fibrine dans les sinusoides (MacPhee *et al.*, 1988). L'examen du foie en

microscopie électronique a permis de corrélérer la progression de la coagulation intravasculaire dans les sinusoides avec la nécrose hépatocellulaire extensive (MacPhee *et al.*, 1988; Levy & Abecassis, 1989). L'initiation de la cascade de coagulation serait consécutée à l'induction, par le MHV3, de l'activité de la prothrombinase membranaire fgl2 exprimée spécifiquement à la surface des KC et des LSEC (Ding *et al.*, 1997, 1998).

Chez les souris de susceptibilité génétique intermédiaire (C3H, SJL), l'infection par le MHV3 mène à une hépatite chronique, secondaire à une hépatite aigüe moins sévère (Le Prevost *et al.*, 1975). Des particules infectieuses et des antigènes viraux sont détectables dans le foie jusqu'à 4 mois p.i (Martin *et al.*, 1994). Une vasculite, observée dans la région terminale des veinules portales et associée à des dépôts de fibrine subendothéliaux, est la principale manifestation pathophysiologique de l'hépatite chronique induite par le MHV3 (Le Prevost *et al.*, 1975). Des foyers de nécrose hépatocellulaire et la présence de thrombi dans les sinusoides sont aussi notés mais ne sont pas extensifs et les anomalies microvasculaires sont confinées aux régions où des lésions hépatiques sont observables, corrélant avec des niveaux moindres du facteur procoagulant fgl2 (MacPhee *et al.*, 1985). Au contraire, la lignée de souris résistantes A/J développe une hépatite subclinique avec peu ou pas de lésions hépatiques bien que des titres viraux soient décelables dans le foie (Lamontagne *et al.*, 1989b). Les particules virales infectieuses sont complètement éliminées du foie et de la circulation périphérique à 7 jours p.i.

Il a été démontré que la sensibilité à l'infection hépatique par le MHV3, selon la génétique murine, ne corrélait pas avec les niveaux de réplication virale dans le foie (Lamontagne *et al.*, 1989b). Il a été suggéré que la résistance ou la susceptibilité à l'infection soit reliée, parallèlement à l'expression différentielle des allèles H-2 et des isoformes du récepteur CEACAM1, à des différences dans la permissivité des macrophages et des LSEC à la réplication virale selon les lignées. En effet, une restriction partielle de la réplication virale chez les macrophages de souris résistantes A/J, résultant d'un contrôle cellulaire intrinsèque par la production d'IFN- $\gamma$ , a déjà été rapportée (Lamontagne *et al.*, 1989a; Mello *et al.*, 1993). De plus, un délai de 24 à 36h dans la réplication du MHV3 au niveau des LSEC des souris A/J

suggère qu'une infection productive précoce des LSEC serait un facteur contributif à la pathogenèse chez les souris susceptibles (Pereira *et al.*, 1984).

### **2.6.5.2- Les anomalies neurologiques induites par le MHV3**

Lors d'infections de souris génétiquement susceptibles C57Bl/6 ou BABL/c avec le virus MHV3 par la voie i.p., aucun signe clinique neurologique ni de lésions dans le SNC ne sont apparents (Virelizier *et al.*, 1975; Tardieu *et al.*, 1986) mais des titres viraux sont néanmoins décelables dans le cerveau dès 48h p.i. (Tardieu *et al.*, 1986; Lamontagne & Dupuy, 1987). L'examen histopathologique à 72h p.i. ne montre aucune anomalie du tissu cérébral à l'exception de quelques infiltrations périveineuses et périartérielles de polymorphonucléaires et mononucléaires, et quelques foyers nécrotiques neuronaux au niveau de l'hippocampe (Virelizier *et al.*, 1975). L'invasion cérébrale par voie hématogène semble spécifique au sérotype MHV3 puisqu'aucun titre intracérébral du MHV-A59, pourtant considéré neurotrope suite à l'injection intracrâniale ou intranasale, n'est détecté suite à une infection par voie i.p. (Lavi *et al.*, 1986; Godfraind *et al.*, 1997). Il a été proposé, mais non démontré, que la BHE pourrait prévenir l'invasion du SNC par le MHV-A59, malgré l'expression fonctionnelle du récepteur CEACAM1a sur les BMEC (Godfraind & Coutelier, 1998). Ces observations suggèrent que l'infection par le MHV3 pourrait entraîner des anomalies structurales et fonctionnelles de la BHE.

Chez la lignée murine C3H, l'infection par voie i.p. du virus MHV3 se traduit par le développement progressif d'une neuropathologie chronique caractérisée par une épendymite, une vasculite, une méningite et une encéphalite sans toutefois d'atteintes de la matière blanche (démýélinisation) (Virelizier *et al.*, 1975; Tardieu *et al.*, 1982; Tardieu *et al.*, 1986). Ces manifestations neuropathologiques corrént avec un tropisme élevé du MHV3 pour les cellules épendymales et les cellules méningeales, un tropisme modéré pour les cellules endothéliales de la BHE, mais nul pour les oligodendrocytes et les astrocytes purifiés de souris C3H et/ou C57Bl/6 (Tardieu *et al.*, 1986; Joseph *et al.*, 1995). La maladie progresse vers une paralysie et une hydrocéphalie entre les 3<sup>e</sup> et 6<sup>e</sup> mois p.i. puis la mort de l'animal entre 6 et 12 mois p.i. (Virelizier *et al.*, 1975; Jolicoeur & Lamontagne, 1994). Le virus persiste dans le

cerveau de l'animal suite à une immunodéficience humorale et cellulaire progressive (Jolicoeur & Lamontagne, 1994) et peut être détecté dans le foie, la rate et les ganglions durant les deux premiers mois d'infection et jusqu'à 8 mois p.i dans le cerveau (Virelizier *et al.*, 1975; Jolicoeur & Lamontagne, 1994).

En comparaison, l'inoculation du MHV-A59 par voie intracérébrale ou intranasale provoque une encéphalite aiguë modérée à sévère, caractérisée par une infiltration inflammatoire importante (Bender & Weiss, 2010). Les titres viraux atteignent un sommet à 5 jours p.i. puis déclinent jusqu'à devenir indétectables après 2 semaines p.i. Toutefois, l'immunité stérile n'est pas atteinte puisque des protéines et des ARN viraux persistent dans le SNC (Lavi *et al.*, 1984; Matthews *et al.*, 2001) si bien qu'une paralysie spastique subaiguë et une neuropathologie chronique, caractérisée par une démyélinisation dans le SNC et la moelle épinière, s'installent après environ 4 semaines p.i. et peuvent progresser pendant plus de 6 mois (Lavi *et al.*, 1984; Rempel *et al.*, 2004). La chronicité de la pathologie induite par le MHV-A59 est liée à une infection persistante des astrocytes, oligodendrocytes et à un moindre degré des neurones (Lavi *et al.*, 1987).

### **2.6.5.3- Réponses immunes induites lors d'infections par le MHV3**

La réponse immunitaire joue un rôle déterminant dans l'élimination du MHV3 lors la phase aiguë ou chronique de l'infection tel que démontré par la susceptibilité des souris thymectomisées A/J, normalement résistantes à l'infection par le MHV3 (Dupuy *et al.*, 1975). Cependant, le tropisme du virus pour plusieurs cellules immunitaires entraîne des anomalies fonctionnelles et des déficiences cellulaires importantes des populations lymphoïdes et myéloïdes qui corrèlent avec la pathogénicité de ce sérotype.

#### **2.6.5.3.1- Les anomalies de la réponse innée lors de l'infection par le MHV3**

L'infection par les voies i.p. ou orale de souris susceptibles par le MHV3 gagne rapidement le foie, où a lieu la réplication primaire, puis se dissémine ensuite, via la circulation sanguine, à plusieurs organes affichant un tropisme pour le virus (ex. cerveau, organes lymphoïdes) (Le



Prévost *et al.* 1975; Virelizier *et al.* 1975; Tardieu *et al.* 1986; Lamontagne *et al.* 1989b). Les macrophages de plusieurs organes (KC, péritonéaux et myéloïdes) sont des cibles importantes du MHV3, dont l'infection entraîne l'apparition de cellules géantes multinuclées issues de la fusion de plusieurs cellules (syncytia) (Lamontagne *et al.*, 1989a; Schindler *et al.*, 1983). Cependant, il a été montré que les macrophages infectés et stimulés par le ligand TLR-3 synthétique poly I : C pouvaient supprimer la réplication virale par la production d'IFN- $\beta$  (Mazaleuskaya *et al.*, 2012). Les macrophages péritonéaux infectés peuvent contribuer à l'établissement d'une défense innée par la production rapide des cytokines IL-6 et TNF- $\alpha$  (Jacques *et al.* 2009b). Il a d'ailleurs été rapporté qu'une augmentation de TNF- $\alpha$  sérique était décelable chez les souris infectées avant même l'apparition du virus dans le foie (Devictor *et al.*, 1992). Cependant, la production précoce de TNF- $\alpha$  participerait à la coagulation intravasculaire (Liu *et al.*, 2015) et serait conséquemment un facteur déterminant dans la fulminance de l'hépatite chez les souris susceptibles tel que démontré par une hépatite moins sévère et un retard dans la mortalité chez des souris déficientes pour le TNF- $\alpha$  ou son récepteur (TNFR1) (Xu *et al.* 2014; Yang *et al.*, 2013). Il a été montré que la production du TNF- $\alpha$  dans le foie et par les macrophages, tout comme celle de l'IL-6, dépendait de la fixation du MHV3 au TLR-2 plutôt qu'au récepteur viral CEACAM1a, suggérant un rôle important du TLR-2 dans la réponse inflammatoire intrahépatique (Jacques *et al.* 2009b). Par ailleurs, il a été montré que le sérotype MHV-A59, causant une hépatite modérée, n'induisait pas la production de cytokines inflammatoires via la voie TLR2 chez les macrophages (Zhou *et al.*, 2010). L'importance du TLR2 dans la réponse inflammatoire et innée induite lors de l'infection par le MHV3 de même que son rôle dans la gravité de l'hépatite reste à déterminer.

Un recrutement intrahépatique transitoire de cellules mononucléaires est observé lors de l'infection aigüe des souris susceptibles C57Bl/6 alors que la cellularité de la moelle osseuse, de la rate et du thymus diminue parallèlement, conséquence du lymphotropisme du MHV3, provoquant une immunodéficience systémique progressive (Jolicoeur & Lamontagne, 1994; Lamontagne *et al.*, 1997). En effet, bien que les cellules NK et NK-T soient sollicitées dans le foie dès 48h p.i., leur permissivité à la réplication virale entraîne leur apoptose post-réplication et une chute concomitante de cellules NK dans la rate et la moelle osseuse (Jacques *et al.*,

2008; Lehoux *et al.*, 2004). La perte des cellules NK et NK-T intrahépatiques corrèle avec une diminution importante des niveaux d'IFN- $\gamma$  dans le foie (Jacques *et al.* 2008), une cytokine importante dans le contrôle de l'infection aiguë (Jacques *et al.*, 2009a; Vassão & Pereira, 1994). Une régulation à la baisse des niveaux des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- $\beta$  (Jacques *et al.* 2008), corrélant inversement avec les taux de cytokines inflammatoires (Jacques *et al.* 2009b), est aussi observée dans le foie des souris infectées. Il a été démontré que les chutes des populations NK et NK-T et des cytokines anti-inflammatoires étaient amoindries ou absentes chez les souris infectées avec les variants atténués 51.6-MHV3 et YAC-MHV3 (Jacques *et al.* 2008), suggérant un rôle important du maintien de la réponse innée et de l'équilibre tolérance/inflammation du foie dans la gravité de l'hépatite. D'autre part, la réponse innée dans le SNC lors d'infection par le virus MHV3 n'est absolument pas connue.

#### **2.6.5.3.2- Les anomalies de la réponse immune adaptative lors de l'infection par le MHV3**

L'infection aiguë par le MHV3 se traduit aussi par une augmentation transitoire des populations de cellules T CD4+ et CD8+ dans le foie (Lamontagne *et al.* 1997) mais leur absence de prolifération en réponse aux mitogènes ConA et PHA suggère des anomalies fonctionnelles importantes (Lamontagne *et al.*, 2001). Une chute drastique des populations de lymphocytes T et B dans la rate et des sous-populations de cellules T dans le thymus est notée dès 48h p.i., se traduisant par une atrophie importante des organes lymphoïdes (Lamontagne *et al.*, 1989b; Lamontagne & Jolicoeur, 1991). La perte des lymphocytes thymiques, qui n'expriment pas le récepteur viral CEACAM1, résulte plutôt de l'infection des cellules stromales et des DC thymiques par le virus, provoquant un retard de maturation et indirectement, l'apoptose des thymocytes (Lamontagne & Jolicoeur, 1991; Verinaud *et al.*, 1998). D'autre part, il a été montré que la moelle osseuse et plus particulièrement les sous-populations de cellules B et pré-B, étaient aussi ciblées par l'infection virale. L'immunodéficiência cellulaire et humorale résultant des pertes lymphocytaires serait un facteur aggravant de l'hépatite induite par MHV3 tel que démontré par l'absence de

dommages cellulaires et tissulaires dans les organes lymphoïdes des souris résistantes A/J infectées par le MHV3 ou encore des souris susceptibles infectées par le variant non pathogène YAC-MHV3 (Lamontagne *et al.* 1989a).

Compte tenu de la fulminance de l'hépatite et de la mortalité rapide des souris infectées avec le MHV3, la réponse adaptative cellulaire n'a pas le temps de se développer. Par contre, l'infection avec le virus atténué YAC-MHV3, ne provoquant qu'une hépatite subclinique sans mortalité, a permis de mettre en évidence une réponse adaptative antivirale. Ainsi, il a été montré qu'aucune déficience de lymphocytes T ou B n'était induite dans les organes lymphoïdes. Les lymphocytes CD8 étaient rapidement recrutés dans le foie des souris infectées et maintenaient la capacité de répondre à des lectines au contraire de ceux retrouvés dans le foie de souris infectées avec le virus pathogène MHV3 (Lamontagne *et al.*, 2001). De plus, des niveaux élevés d'anticorps neutralisants étaient retrouvés à plus de 15 jours p.i. Par ces deux mécanismes de défense adaptative, l'élimination virale était effective en moins de 15 jours p.i.

La réponse immune adaptative chez des souris chroniquement infectées par le MHV3 et susceptibles au développement d'une maladie neurologique est peu connue. Des diminutions significatives de la cellularité du thymus, de la rate et des macrophages ont néanmoins été rapportées, quoique moins prononcées que chez les souris susceptibles infectées (Leray *et al.*, 1982; Jolicoeur & Lamontagne, 1994). Des anticorps anti-MHV3, principalement d'isotype IgM, sont retrouvés jusqu'à 60 à 70 jours p.i. mais la production globale d'anticorps anti-MHV3, tous isotypes confondus, diminue progressivement durant les trois premiers mois p.i. puis revient à des valeurs normales chez les souris paralysées. Les réponses humorales dépendantes et indépendantes des cellules T semblent fortement compromises chez les souris paralysées ou non, de même que l'immunité cellulaire étant donné la faible réactivité des cellules T à la ConA (Leray *et al.*, 1982). D'ailleurs, une chute de cellules T et B spléniques est observée dès 48h p.i. et leur nombre est maintenu à un bas niveau jusqu'à la mort de l'animal. Ces déficits cellulaires originent d'une perte de toutes les sous-populations de cellules T au niveau du thymus et des cellules B dans la moelle osseuse (Leray *et al.*, 1982).

Des formes anormales de cellules pré-B, menant à la lyse cellulaire, sont aussi générées dans la moelle osseuse durant l'infection chronique (Jolicoeur & Lamontagne, 1994).

### **2.6.5.3.3- Les réponses innée et adaptative dans le SNC lors d'infections par les sérotypes MHV-A59 et MHV-JHM**

Comme les réponses immunes innée et adaptative induites dans le SNC suite à une infection aiguë ou chronique par le MHV3 sont peu connues et que des études effectuées avec les sérotypes neurotropes MHV-A59 et MHV-JHM ont permis de mettre en lumière la cascade d'événements immunitaires initiés suite à l'invasion virale du SNC, il apparaît important de tenir compte des mécanismes identifiés avec ces sérotypes. Ainsi, les infections intracrâniennes du SNC avec les virus MHV-A59 et -JHM se manifestent par une régulation à la hausse de cytokines et chimiokines proinflammatoires et de métalloprotéases (MMP), lesquelles initient et supportent une réponse antivirale robuste (Lane & Hosking, 2010). Un recrutement de cellules de l'immunité innée telles que des cellules NK, des neutrophiles et des macrophages est observé entre 2 et 5 jours p.i. et corrèle avec l'induction de plusieurs cytokines et chimiokines dont l'IL-1 $\beta$ , l'IL-12, l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , les CCL2, CCL5 et CCL3 et à un moindre niveau les IFN de type I (Iacono *et al.*, 2006; Lane & Hosking, 2010; Parra *et al.*, 1997; Rempel *et al.*, 2004; Templeton *et al.*, 2008; Zuo *et al.*, 2006). Ces derniers, sécrétés par la microglie suite à la détection virale par l'hélicase MDA-5 (Roth-Cross *et al.*, 2008), limiteraient la dissémination virale dans le SNC, entre autre via l'induction d'IFIT2 (IFN-induced proteins with tetratricopeptide repeats type 2) (Butchi *et al.*, 2014) et seraient primordial dans le contrôle de l'infection virale tel que démontré par une mortalité précoce chez des souris déficientes pour les récepteurs des IFN- $\alpha/\beta$  (Roth-Cross *et al.*, 2007). L'IL-6 et le TNF- $\alpha$ , produits par les astrocytes infectés, supporteraient davantage la réponse inflammatoire médiée par les cellules de l'immunité innée (Yu *et al.*, 2009). Les neutrophiles seraient importants dans le contrôle précoce de l'infection neurologique car il a été montré, avec le modèle d'infection par le MHV-JHM, que leur production de MMP9 était responsable du bris de la BHE à 4 jours p.i., facilitant la migration subséquente de leucocytes inflammatoires (Zhou *et al.*, 2003).

D'ailleurs, une infiltration intracérébrale importante de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, en réponse aux chimiokines CXCL9 et CXCL10, est observable entre 5 et 7 jours p.i. (Iacono *et al.*, 2006; Marten *et al.*, 2003; Stiles *et al.*, 2006). L'immunité protectrice et le contrôle de la réplication virale intracérébrale dépend d'une réponse Th1 effectrice et de l'activité cytolytique et la production précoce d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> recrutés (Bergmann *et al.*, 2003; Rempel *et al.*, 2004). En effet, il a été montré que les granules cytotoxiques (perforines et granzymes) des cellules T CD8<sup>+</sup> entraînaient la lyse des astrocytes et de la microglie infectés alors que l'IFN- $\gamma$ , produit par les cellules Th1 et CD8<sup>+</sup>, contrôlait la réplication virale dans les oligodendrocytes (Lin *et al.*, 1997; Parra *et al.*, 1999). La survie et l'activité cytolytique des CD8<sup>+</sup> étaient fortement dépendantes de la présence des cellules Th1 (Stohlman *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2005). Des cellules B, aussi recrutées dans le SNC dès 5 jours p.i., et leur production subséquente d'anticorps neutralisants (Tschen *et al.*, 2002), ne participent pas, contrairement aux cellules T, à l'élimination virale durant la phase aiguë de l'infection mais préviendrait la recrudescence virale lors de la phase chronique (Lin *et al.*, 1999; Ramakrishna *et al.*, 2003). Leur rôle crucial a été mis en évidence chez des souris déficientes en lymphocytes B matures et infectées chroniquement avec le MHV-A59 chez lesquelles le contrôle de la réplication virale dans le SNC était fortement compromis (Matthews *et al.*, 2001). Les souris survivant à la phase aiguë montrent une absence de titres viraux intracérébraux et d'infiltration leucocytaire à deux semaines p.i., quoique des macrophages et des cellules T sensibilisées demeurent dans le SNC jusqu'à trois mois p.i. (Castro *et al.*, 1994; Marten *et al.*, 2000; Ramakrishna *et al.*, 2004). Cependant, malgré la réponse immune antivirale induite lors de la phase aiguë, des antigènes et des ARN viraux sont encore détectables dans les oligodendrocytes infectés (Lane *et al.*, 1998) et les souris développent, deux semaines plus tard, une neuropathie démyélinisante. Dans le modèle d'infection par le MHV-JHM, les principaux effecteurs de la démyélinisation sont les cellules T et les macrophages (Lane & Hosking, 2010) alors que la démyélinisation induite lors de l'infection avec le MHV-A59 est indépendante des réponses immunes adaptatives humorale (Matthews *et al.*, 2002) et cellulaire (Sutherland *et al.*, 1997).

#### 2.6.5.4- Mécanismes d'évasion des virus MHV des réponses immunes de l'hôte

Plusieurs travaux effectués avec le sérotype MHV-A59 suggèrent l'acquisition par les MHV de stratégies virales de contournement des défenses innées en évitant la reconnaissance par les PRRs intracellulaires (Rose & Weiss, 2009). Par exemple, il a été montré que le virus est peu détecté par les senseurs viraux MDA-5, TLR3 et RIG-I, possiblement par la séquestration des ARN viraux dans des vésicules intracellulaires à double membrane lors de la réplication qui constitueraient des sites privilégiés (Versteeg *et al.*, 2007; Zhou & Perlman, 2007). Cependant, cette capacité d'évasion des senseurs serait spécifique de la nature de la cellule-hôte, car bien qu'aucune induction d'IFN- $\beta$  ne soit notée chez les neurones, les astrocytes et les fibroblastes infectés, la production par la microglie ne semble pas affectée (Roth-Cross *et al.*, 2008). Advenant un échec dans l'évitement de la reconnaissance par les PRR, des composants viraux, produits lors du cycle réplcatif, peuvent supprimer ultérieurement l'activation des voies antivirales chez les cellules infectées. En effet, il a été rapporté que les protéines virales N, nsp1 et nsp3 du MHV-A59 interfèrent spécifiquement avec la production ou encore avec l'activité et la signalisation des IFN de type I (Rose & Weiss, 2009; Ye *et al.*, 2007; Züst *et al.*, 2007).

Il a été montré, tel que mentionné précédemment, que la sévérité de l'hépatite induite par le MHV3 ne corrèle pas avec les niveaux de réplication virale puisque des titres viraux comparables ont été rapportés dans le foie de souris de lignés susceptibles et résistantes (Lamontagne *et al.*, 1989b). Les analyses histopathologique et cellulaire comparatives du foie et des organes lymphoïdes de souris susceptibles et résistantes infectées ont permis de mettre en évidence une relation entre la sévérité de l'hépatite et le niveau des désordres cellulaires et immunitaires engendrés par l'infection. Il a été proposé que l'intégrité de la moelle osseuse et du thymus soit associée à la protection et à la résolution de l'infection par le MHV3 étant donné l'absence de désordres lymphopoïétiques chez les souris résistantes A/J (Lamontagne *et al.*, 1989b; Jolicoeur & Lamontagne, 1994). En fait, les déficits cellulaires causés par le MHV3 au niveau des tissus lymphoïdes primaires conduisent à l'impossibilité de compenser les pertes de cellules B et T spléniques. L'immunodéficience humorale et cellulaire

systémique résultante contribuerait alors à diminuer les capacités de l'hôte à contrôler l'infection virale et à favoriser son élimination (Jolicoeur & Lamontagne, 1989).

D'ailleurs, il a été démontré que les déficits immunitaires périphériques induits lors de l'infection aiguë par le MHV3 favorisent la persistance virale et le développement d'une neuropathologie chronique. En effet, il a été montré qu'un transfert adoptif syngénique de lymphocytes B et T CD4<sup>+</sup> et/ou CD8<sup>+</sup> à des souris C3H infectées compensait l'immunodéficience en restaurant partiellement le pool de cellules T et B dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires et prévenait l'apparition de désordres neurologiques chroniques (Lamontagne *et al.*, 1996). Récemment, des déficiences fonctionnelles des cellules T CD8<sup>+</sup> intracérébrales, induites lors d'infection chronique par le MHV-JHM, ont été proposées comme mécanisme de persistance des MHVs dans le SNC (Phares *et al.*, 2009). Le développement de plusieurs variants d'échappement antigénique et de quasi-espèces, générés lors d'infections par les MHVs, favorise aussi l'évasion virale des défenses de l'hôte (Bergmann *et al.*, 1998; Pewe *et al.*, 1996).

## 2.7- Hypothèses

Des dysfonctions au niveau des EC de la BHE et des sinusoides hépatiques ont été rapportées dans des neuropathologies d'origine virale et lors d'hépatites virales aiguës ou chroniques (Guzmán-Fulgencio *et al.*, 2011; Spindler & Hsu, 2012). Constituant la porte d'entrée obligatoire des virus circulants par voie hématogène afin d'atteindre leurs organes cibles, l'endothélium vasculaire peut établir une première ligne de défense antivirale et ainsi prévenir la dissémination virale. Cependant, la susceptibilité des EC à l'infection virale pourrait compromettre l'intégrité de cette barrière et plutôt favoriser l'infection virale. Les MHV, par leur tropisme pour les EC et leur capacité à induire des hépatites et des maladies neurologiques de sévérité variable selon les sérotypes (Lane & Hosking, 2010), constituent un modèle idéal pour l'étude des dysfonctions des EC de la BHE et des sinusoides hépatiques induites par l'infection virale. Compte tenu de l'importance des LSEC et des BMEC dans le contrôle des infections virales du foie et du SNC respectivement, il est postulé que :

**Hypothèse générale : Le niveau de pathogénicité des coronavirus pour le foie et le cerveau corrèle avec des anomalies fonctionnelles et structurales des LSEC et des BMEC induites par l'infection virale.**

Les EC des sinusoides hépatiques sont les principales cellules responsables de la tolérance hépatique. Il a récemment été rapporté que lors d'infections virales, les LSEC pouvaient produire des cytokines inflammatoires et promouvoir une immunité anti-virale (Nakamoto & Kanai, 2014; Liu *et al.*, 2013). Leur rôle lors d'hépatite virale demeure cependant peu connu. Il est bien admis que les dommages hépatiques associés à l'hépatite virale résultent principalement d'une réponse immunopathologique exubérante plutôt que de l'infection virale (Bortolami *et al.*, 2008). Conséquemment, un débalancement précoce du fragile équilibre entre l'activité tolérogénique et pro-inflammatoire des LSEC lors de la phase aiguë de l'infection pourrait avoir un impact considérable sur la progression de la maladie en exacerbant la réponse inflammatoire et les dommages hépatiques subséquents. L'hépatite aiguë fulminante induite par le MHV3 est un modèle privilégié pour l'étude des désordres inflammatoires et immunopathologiques associés à l'infection virale (Jolicoeur & Lamontagne, 1994). Il a été rapporté que le MHV3 régulait à la baisse les niveaux intrahépatiques des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- $\beta$  (Jacques *et al.* 2008) mais augmentait inversement les niveaux d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  (Jacques *et al.* 2009b). Cependant, la chute des cytokines anti-inflammatoires était amoindrie ou absente chez les souris infectées avec le variant atténué 51.6-MHV3, caractérisé par une absence de tropisme pour les LSEC (Jacques *et al.* 2008).

**Hypothèse spécifique 1 :**

Il est donc postulé que l'infection et la réplication du MHV3 dans les LSEC conduisent à une perturbation de leurs propriétés tolérogéniques et vasculaires qui contribue à la sévérité de la réponse inflammatoire et de l'hépatite.

D'autre part, la réponse inflammatoire hépatique induite lors d'infection virale résulte principalement de l'activation des PRR intracellulaires (hélicases et TLR endosomaux) (Broering *et al.*, 2011) non seulement dans les LSEC mais dans l'ensemble des cellules



hépatiques permissives à la replication virale et impliquées dans la réponse innée. Des évidences récentes suggèrent que le TLR2 pourrait aussi contribuer à la reconnaissance virale et la réponse inflammatoire subséquente par la détection de protéines virales de surface, mais son rôle dans l'hépatite reste inconnu (Dolganiuc *et al.*, 2004; Hoffmann *et al.*, 2009). Néanmoins, des études récentes ont rapporté une sur-expression du TLR2 dans le foie et sur les monocytes de patients infectés par HCV corrélant avec le niveau d'inflammation et les dommages hépatiques (Riordan *et al.*, 2006; Berzsenyi *et al.*, 2011; Ronit *et al.*, 2013). D'autre part, des travaux antérieurs ont montré que l'induction par le MHV3 de la production des cytokines inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-6 par des macrophages infectés dépendait de l'activation du TLR2 par la glycoprotéine de surface (S) virale plutôt que de sa liaison au récepteur CEACAM1a (Jacques *et al.* 2009b) alors que le sérotype MHV-A59, causant une hépatite aiguë modérée, n'induisait pas la production de cytokines inflammatoires via la voie TLR2 chez les macrophages (Zhou *et al.*, 2010).

### **Hypothèse spécifique 2 :**

Il est donc proposé que l'activation spécifique du TLR2 par le MHV3 lors de la phase aiguë de l'infection exacerbe la réponse inflammatoire et les dommages hépatiques et soit un facteur important de la pathogénicité de ce sérotype.

La BHE, en contrôlant les échanges sang-cerveau et en prévenant l'invasion cérébrale par la majorité des agents pathogènes, joue un rôle déterminant dans le maintien de l'homéostasie du SNC (Hawkins & Davis, 2005). Certains virus ont néanmoins développé des stratégies visant à compromettre l'intégrité de la BHE pour envahir le SNC et causer des neuropathologies suite à une infection primaire périphérique (Spindler & Hsu, 2012). Les mécanismes de neuroinvasion privilégiés par les CoV n'ont pas encore été élucidés. Il a néanmoins été rapporté que lors d'infections par voie i.p. avec les sérotypes fortement hépatotrope MHV3 et moyennement hépatotrope MHV-A59, le MHV3 pouvait se disséminer au cerveau suivant une réplication primaire dans le foie (Tardieu *et al.*, 1986; Lavi *et al.*, 1986), suggérant que l'intégrité des EC de la BHE et/ou que leur capacité à contrôler l'invasion virale du SNC soit différemment affectées selon la virulence des sérotypes. Puisqu'il été démontré que les MHV3 et MHV-A59 se fixent au même récepteur viral CEACAM1a présent sur les BMEC (Joseph *et*

*al.*, 1995, Godfraind *et al.*, 1997), d'autres facteurs que la permissivité des BMEC à l'infection virale pourraient être impliqués dans la spécificité d'invasion de la BHE par le MHV3.

**Hypothèse spécifique 3 :**

Il est donc postulé que l'invasion cérébrale par le MHV3 corrèle avec des déficits dans le contrôle de l'infection hépatique primaire et soit conséquente à une altération directe ou indirecte des protéines de jonctions serrées des BMEC par l'infection virale.

## **3- RÉSULTATS**

### **3.1- Article 1 : Mouse hepatitis virus infection reverts liver sinusoidal endothelial cell tolerogenic functions in acute hepatitis.**

Cet article est actuellement en révision pour Journal of Virology.

À titre d'auteur principal, j'ai fait une contribution majeure à cet article. J'ai contribué de manière significative à la recherche méthodologique, à la mise au point et à la réalisation de la majorité des protocoles expérimentaux (95%), à l'analyse des résultats et la rédaction de l'article en collaboration avec Dre Lamontagne. Aveline Filliol et Dr. Michel Samson ont contribué à la réalisation et à l'analyse des colorations histologiques ainsi qu'à la révision du manuscrit.

**MOUSE HEPATITIS VIRUS INFECTION REVERTS LIVER SINUSOIDAL  
ENDOTHELIAL CELL TOLEROGENIC FUNCTIONS IN ACUTE HEPATITIS**

**Christian Bleau<sup>1</sup>, Aveline Filiol<sup>2</sup>, Michel Samson<sup>2</sup>, and Lucie Lamontagne<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Department of Biological Sciences, Université du Québec à Montréal, Montreal Canada,  
H3C 3P8; <sup>2</sup>U.1085 Inserm, IRSET, Institute of Research in Environmental and Occupational  
Health, Université de Rennes 1, 35043 Rennes, France*

**Corresponding author**

Dre Lucie Lamontagne DMV, Ph.D  
Département Sciences Biologiques  
Université du Québec à Montréal,  
C.P. 8888 Succ. Centre-Ville  
Montréal, Qué.  
H3C 3P8

**Running title or key words:** liver sinusoidal endothelial cell, mouse hepatitis virus, inflammation, tolerance, interferon- $\beta$ , cytokines, chemokines, Fgl2, caveolin, IL-33.

### 3.1.1- Abstract

Under physiological conditions, the liver parenchymal and non-parenchymal cells preserve hepatic tolerance to self and gut-derived antigens. The liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) act as primary mediators of hepatic immune tolerance in expressing anti-inflammatory mediators. Upon viral infection, LSECs can switch from a tolerogenic to an immunogenic phenotype and release proinflammatory factors, but the importance of such reversion in an imbalance between antiviral innate immune defense and inflammation-driven hepatic damages during acute viral hepatitis is poorly known. Using the highly hepatotropic mouse hepatitis virus (MHV) type 3, that induces fulminant hepatitis, and its attenuated variants 51.6-MHV3 and YAC-MHV3, having lower tropism for LSECs, we investigated *in vitro* the impact of LSECs infection on their tolerogenic/inflammatory properties, and its consequence in the aggravation of acute hepatitis process *in vivo*. We demonstrated that LSECs are permissive *in vitro* to pathogenic MHV3 replication, and that 51.6-MHV3 and YAC-MHV3 infections are delayed due in part to higher IFN- $\beta$  induction. LSECs infection by MHV3 disturbed their tolerogenic and vascular functions in promoting release of inflammatory TNF- $\alpha$ , IL-6 and chemokines CXCL-1, CCL2 and CXCL10, alarmin IL-33, caveolin-1, procoagulant factor Fgl-2, simultaneously with reduced production of NO and tolerant IL-10 in contrast to the attenuated 51.6- and YAC-MHV3 strains. Dysregulation of LSECs by MHV3 was reflected *in vivo* by fulminant hepatitis, disturbances in vascular factors and higher levels of viral replication, inflammatory cytokines and chemokines when compared with 51.6- and YAC-MHV3 strains. These results highlight that productive infection of LSECs and consecutive alteration of their tolerogenic and vasoactive properties is a key element in the severity of inflammatory responses and liver damages during acute viral hepatitis.

### 3.1.2- Introduction

Under physiological conditions, the liver is continuously exposed to gut-derived food and microbial antigens (such as LPS) via the portal circulation and adopts mechanisms of immune tolerance to prevent LPS-driven inflammatory responses. Given their anatomical situation and their high numbers of fenestrations, liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) act as a sieving barrier to control exchanges between the blood and the liver parenchyma and play a major role in liver tolerance through sentinel and scavenger functions that contribute to hepatic clearance of portal delivered antigens (reviewed in Thomson & Knolle, 2010; Wisse *et al.*, 1985). Co-localized in LSEC fenestrations, caveolin-1 (CAV-1) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) interact and control NO release, a major component in the regulation of sinusoidal blood flow by LSECs (Oda *et al.*, 2003; Yokomori *et al.*, 2001).

In agreement with their tolerogenic functions, LSECs were shown to display a restricted toll like receptor activation profile to gut-derived microbial products (Kern *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010) and produce high amounts of immunosuppressive cytokines, such as tumor growth factor (TGF)- $\beta$  and IL-10 that promote liver tolerance and tissue regeneration (Bissell *et al.*, 1995; Knolle *et al.*, 1998). LSECs were also shown to tolerogenize activated CD8<sup>+</sup> T cells through their constitutive expression of the inhibitory ligand PD-L1 and to promote differentiation of naive CD4<sup>+</sup> T cells into regulatory T cells (Diehl *et al.*, 2008; Kruse *et al.*, 2009). However, upon viral infection or stimulation by TLR1/2, but not TLR3 or TLR4 ligands, LSECs switch to an immunogenic state and can induce virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell immunity through a CD80 and CD86-independent mechanism (Liu *et al.*, 2013).

Hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) infections are serious health problem infecting over 350 million and 170 million people worldwide respectively (Lavanchy, 2009; Yang *et al.*, 2015). Most liver damages caused by HBV/HCV infection are primarily attributed to the exacerbated immunopathological response triggered by viral infection rather than direct injury caused by viral replication (Bortolami *et al.*, 2008; Moriyama *et al.*, 1990). Previous studies have reported that LSECs exhibited high capacity to take up HBV and HCV from the bloodstream (Breiner *et al.*, 2001; Pöhlmann *et al.*, 2003) and to control HCV replication

through production of IFN- $\beta$  (Broering *et al.*, 2008). Other studies rather suggested that LSECs promote HCV replication through production of BMP4, a member of the TGF- $\beta$  superfamily (Rowe *et al.*, 2014), and act as a reservoir for HCV transmission to hepatocytes (Ludwig *et al.*, 2004). In addition, the alarmin IL-33 and the fibrinogen-like factor 2 (Fgl-2), a prothrombinase promoting vascular thrombosis and hepatic inflammation, mainly produced by LSECs, are up-regulated in acute liver failure or chronic HBV/HCV infections (Foerster *et al.*, 2010; Marvie *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2005). Since sustained hepatic inflammation results in oxidative stress and important damages to parenchyma, the identification of the mechanisms that predispose to exacerbation of liver inflammation during acute viral hepatitis is crucial to limit extensive immune-mediated hepatocyte injury and prevent liver failure.

The well established mouse hepatitis virus type 3 (MHV3) model was used to unravel the role of LSECs in hepatic inflammation during the acute phase of viral hepatitis. This virus, belonging to coronavirus family, causes fulminant hepatitis with extensive hepatocyte necrosis and death of susceptible C57BL/6 mice within 3–4 days (Dupuy *et al.*, 1975). MHV3 infects LSECs, hepatocytes, Kupffer and Ito cells (Martin *et al.*, 1994) which are cells expressing the carcinoembryonic antigen 1a viral receptor (CEACAM1a) (Belouzard *et al.*, 2012). An implication of LSECs in acute hepatitis is supported by previous findings showing early structural and vascular disorders during MHV3 infection. Indeed, Steffan *et al.* (1995) reported a reduction in the number of LSECs fenestrations in MHV3-infected mice and fulminant hepatitis was associated with viral-induced production of Fgl2 by LSECs (Ding *et al.*, 1997). The impact for LSECs infection by MHV3 in liver inflammatory responses is not clearly known but decreases in total liver amounts of IL-10, TGF- $\beta$  and PGE2 have been reported (Jacques *et al.*, 2008). We have also recently shown that MHV3 induced *in vivo* the production of IL-33 by LSECs, an alarmin released by necrotic cells which leads to recruitment of NK-T cells (Arshad *et al.*, 2013). Two attenuated MHV3 variants, the 51-6-MHV3 and the YAC-MHV3 have lost the ability to infect LSECs and represent suitable viral models to unravel the role of LSEC in acute hepatitis. The 51.6-MHV3 variant induces moderate liver necrosis and death of susceptible mice within 5–9 days (Martin *et al.*, 1994)



while the non-pathogenic YAC-MHV3 induces a subclinical hepatitis characterized by few perivascular inflammatory foci and full recovery within 15 days (Lamontagne *et al.*, 1984). The less severe hepatic damages and delayed mortality of mice infected with the attenuated 51.6-MHV3 variant suggest that functional integrity of LSECs may be one determining factor in the control of viral infection and/or liver inflammation.

In this study, we provide evidence that *in vitro* infection of LSECs by the pathogenic MHV3 leads to enhanced production of inflammatory cytokines and chemokines, Fgl-2, IL-33, and CAV-1, and decreased production of NO and IL-10, in contrast to the attenuated 51.6- and YAC-MHV3 variants. The transition of LSECs from tolerogenic to inflammatory state also occurred *in vivo* in mice infected with MHV3 but not with the attenuated viruses and correlated with severity of hepatitis.

### **3.1.3- Material and Methods**

#### **3.1.3.1- Mice**

Female C57BL/6 mice (Charles River, St-Constant, Qc, Canada) were housed in a HEPA-filtered air environment. All experiments were conducted with mice between 8 to 10 weeks of age in compliance with the regulations of the Animal Committee of the University of Quebec in Montreal.

#### **3.1.3.2- Viruses**

MHV3 is a cloned pathogenic substrain isolated from the liver of infected DBA2 mice. The MHV3 virus induces a rapid mortality in C57BL/6 mice within 3 to 4 days post infection (p.i.) (Dupuy *et al.*, 1975). The escape mutant 51.6-MHV3 was selected from the pathogenic MHV3 virus cultured into L2 cells in the presence of S protein-specific A51 monoclonal antibodies (Martin *et al.*, 1994). This variant induces a delayed mortality time (5 to 9 days p.i.) and cannot infect LSECs but retained ability to infect KC, hepatocytes and Ito cells. The non-

pathogenic YAC-MHV3 variant is a cloned substrain produced in persistently infected YAC-1 cells (Lamontagne & Dupuy, 1984). This variant induces no mortality and lower replicates in macrophages. All viruses were passaged less than three times onto L2 cells and their pathogenic properties were assessed routinely.

### **3.1.3.3- Isolation and purification of LSECs**

Mice were euthanized and the portal vein was isolated and injected with 3 mL of HBSS 10nM HEPES followed by 3mL of digestion buffer consisting of 0.2% (w/v) collagenase A in HBSS 10nM HEPES (Sigma Aldrich, St-Louis, MO). The liver was then excised, injected several times with digestion buffer and dissociated by a 30 min incubation in 10 ml of digestion buffer at 37°C on a shaking plate (200 RPM). The resulting cell suspension was passed through a sterile 70µm and a 40µm nylon mesh filter successively (Falcon, BD Biosciences, Mississauga, Ont., Canada) and centrifuged at 400g for 10 min. Cell pellet was resuspended in 3ml of RPMI 1640, layered at the top of a discontinuous 50%/25% Percoll gradient (Sigma Aldrich) and centrifuged at 800g for 20 min without brakes. The interphase between the two density cushions, containing enriched non-parenchymal cells, was collected and washed with PBS. LSECs were then purified using the positive selection PE kit (Stemcell, Vancouver, Canada) with an anti-CD146 monoclonal antibody, a specific marker of endothelial cells including LSECs (Schrage *et al.*, 2008), according to the manufacturer's procedure. LSEC purity was analyzed by cytometry before each experiment and reached over 90%.

### **3.1.3.4- *In vitro* viral infections**

Freshly isolated LSECs were seeded in 24-well plates at a density of  $7,5 \times 10^5$  cells/ ml in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics (Wysent, St-Bruno, Qc, Canada). Cells were then infected with 0.1 multiplicity of infection (MOI) of infectious MHV3, YAC-MHV3 or 51.6-MHV3 and incubated at 37°C, under 5% CO<sub>2</sub> for 24 to 72 h according to experiment. Cell culture supernatants were collected for ELISA assays and total RNA was extracted for qRT-PCR analysis.

### 3.1.3.5- siRNA transfection

LSECs were seeded in 24-well plates at 60 000 cells/ml and transfected with 25 nM of siRNA Flexitude premix (Qiagen, Cambridge, MA) targeting TLR2 mRNA (target sequence: CTCGTTCTCCAGCATTAAA) and with the AllStars Negative Control siRNA as nonsilencing transfection control for 36 h prior to infection for 24 h.

### 3.1.3.6- *In vivo* viral infections

Groups of 6-7 wild type C57BL/6 mice were intraperitoneally infected with  $10^3$  TCID<sub>50</sub> of MHV3, YAC-MHV3 or 51.6-MHV3. Mock-infected mice received a similar volume of PBS (Wysent). Mice were sacrificed by CO<sub>2</sub> anoxia at 24, 48 and 72 h postinfection (p.i.), and liver and blood were collected and frozen for further analyses.

### 3.1.3.7- RNA isolation and RT-qPCR

RNA from *in vitro* infected LSEC was extracted using NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA) according to the manufacturer procedure. Total RNA from frozen liver samples was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Burlington, ON) and residual genomic DNA was removed with the Turbo DNA-free kit (Ambion, Austin, TX). One  $\mu$ g of RNA was retro-transcribed into cDNA using the High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied biosystems, Foster City, CA). Real time PCR amplification was carried out on 25ng cDNA using the HotStart-IT™ SYBR® Green qPCR Master Mix (USB Corporation, Cleveland, OH) on a ABI 7300 system (Applied Biosystems). Primer sets used are listed in Table 3. Threshold cycle values (Ct) were collected and used for “ $\Delta\Delta$ Ct” analysis. The relative gene expression was normalized to HPRT as endogenous control and expressed as a ratio to gene expression in mock-infected mice livers or LSECs (level arbitrarily taken as 1). The specificity of the PCR products was confirmed by melting curve analyses and all qPCR assays were run in duplicate.

**Table I : Primer sets used for quantitative reverse transcription-PCR**

Gene	Forward primer	Reverse primer
HPRT	5'-GAAAGACTTGCTCGAGATGTCATG-3'	5'-CACACAGAGGGCCACAATGT-3'
IFN- $\beta$	5'-CGGACTTCAAGATCCCTATGGA-3'	5'-TGGCAAAGGCAGTGTAACCTCTC-3'
IL-6	5'-TCGGAGGCTTAATTACACATGTTC-3'	5'-TGCCATTGCACAACCTCTTTTCT-3'
TNF- $\alpha$	5'-TCCCAGGTTCTCTTCAAGGGA-3'	5'-GGTGAGGAGCACGTAGTCGG-3'
CCL2	5'-GCAGCAGGTGTCCCAAAGAA-3'	5'-GGTCAGCACAGACCTCTCTCTTG-3'
CXCL10	5'-GGCCATAGGGAAGCTTGAAAT-3'	5'-TCGTGGCAATGATCTCAACAC-3'
ICAM-1	5'-GTCCGCTGTGCTTTGAGAACT-3'	5'-CGGAAACGAATACACGGTGAT-3'
TLR3	5'-TGGGCTGAAGTGGACAAATCT-3'	5'-TGCCGACATCATGGAGGTT-3'
Caveolin-1	5'-GCGCACACCAAGGAGATTG-3'	5'-CACGTCGTCGTTGAGATGCT-3'
TLR7	5'-CAGTGAACCTCTGGCCGTTGA-3'	5'-CAAGCCGGTTGTTGGAGAA-3'
MHV-N	5'-TGGAAGGTCTGCACCTGCTA-3'	5'-TTTGGCCCACGGGATTG-3'
RIG-I	5'-GCCAGAGTGTCAGAATCTCAGTCAG-3'	5'-GAGAACACAGTTGCCTGCTGCTCA-3'
MDA-5	5'-GCCCTCTCCTTCTCTGAGACT-3'	5'-GCTGGAGGAGGGTCAGCAA-3'
IL-33	5'-GCTGCGTCTGTTGACACATTG-3'	5'-GGGAGGCAGGAGACTGTGTAA-3'
Fgl2	5'-CGTTGTGGTCAACAGTTTGGA-3'	5'-GATGTTGAACCGGCTGTGACT-3'
CXCL1	5'-CCGAAGTCATAGCCACACTCAA-3'	5'-CAAGGGAGCTTCAGGGTCAA-3'
CD31	5'-TGCAGGCATCGGCAAAG-3'	5'-GCATTCGCACACCTGGAT-3'
IL-10	5'-GATGCCCCAGGCAGAGAA-3'	5'-CACCCAGGGAATTCAAATGC-3'
TGF- $\beta$	5'-AGCGCTCACTGCTCTTGTGA-3'	5'-GCTGATCCCGTTGATTTCCA-3'
IRF-3	5'-CAAGGACGGAGCCGTGTT-3'	5'-TCCATGAAGGCAATCAGATCTG-3'
IRF-7	5'-AAATGCTGGGCTCCAAACC-3'	5'-GAGGTCCCCGGCATCAC-3'

### 3.1.3.8- ELISA and nitric oxide assays

Frozen liver samples from C57BL/6 mice were weighted and homogenized in NP40 lysis buffer (InVitrogen, Burlington, ON) completed with a protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich, St-Louis, MA) and 1 mM PMSF for protein extraction. Liver suspension was kept on ice for 30 min and centrifuged 10 min at 13000 RPM. Determination of IFN- $\beta$  (PBL, Piscataway, NJ), IL-6, TNF- $\alpha$  (BD BioSciences, San Jose, CA) CXCL10, CCL2 (eBiosciences, San Diego, CA), CXCL1 and IL-33 (R&D systems Minneapolis, MN) in liver

lysates and/or LSEC culture supernatants was carried out by ELISA tests. Levels of nitric oxide (NO) were quantitated using the Griess reagent assay (InVitrogen, Burlington, ON) according to the manufacturer's procedure.

### **3.1.3.9- Histopathological, transaminase levels and immunohistochemical analyses**

The histopathological analysis of liver was done by hematoxylin-eosin-safranine staining. Determination of serum ALT and AST transaminases was performed according to the IFCC primary reference procedures using Olympus AU2700 Autoanalyser<sup>®</sup> (Olympus Optical, Tokyo, Japan). Immunolocalization of IL-33 was performed by histochemistry staining using primary goat anti-mouse-IL-33 (R&D System) and secondary HRP-conjugated rabbit anti-goat antibody (Dako, Markham, Ont, Canada). CAV-1 was stained with OmniMap anti-Rabbit-HRP (RUO) followed by hematoxylin counterstaining in Ventana machine (Ventana Medical Systems, Inc. Tucson, AZ), as previously described (Arshad *et al.*, 2013).

### **3.1.3.10- Cytofluorometric studies**

Livers were perfused with PBS through the portal vein to remove blood cell contamination prior to dissection. Liver tissues were then homogenized and hepatocytes were removed by sedimentation. Inflammatory cells were enriched using 35% Percoll gradient (Sigma Aldrich) and red blood cells were lysed with a Tris-buffered *ammonium* chloride solution. A million ( $10^6$ ) of leucocytes were incubated with anti-CD16/32 antibodies (BD Biosciences) to block non-specific binding.

Cells were incubated with optimal dilutions of anti-CD3-V500, anti-Gr1-V450, anti-CD11b-PE-Cy7, anti-CD19-APC, anti-CD4-FITC, anti-NK1.1-PerCP-Cy-5.5 and anti-CD8-APC-Cy7 antibodies (BD Biosciences) and fixed in PBS containing 2% FCS, 0.01 M sodium azide and 2% formaldehyde. Stained cells were analyzed on a FACS Aria II<sup>®</sup> flow cytometer using BD FACS Diva software (BD Bioscience) and the data were processed using CXP software (Beckman Coulter, Mississauga, Ont, Canada). Dead cells and doublet cells were excluded on the basis of forward and side scatter and analyses were performed on 10,000 events recorded.

Myeloid cells, gated by high side scatter, were assessed for CD11b and Gr1 to enumerate macrophages (CD11b+Gr1<sup>inter</sup>) and neutrophils (CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>high</sup>). Lymphoid cells were gated according to FSC/SCC and first assessed for NK1.1 and CD3 expression to discriminate NK from NKT cells. CD3+NK1.1- T cells were further gated to allow determination of CD4+ and CD8+ subpopulations. B lymphocytes were determined by CD19+ CD3- expression.

### **3.1.3.11- Virus titration**

Frozen liver samples from 24 and 72 h MHV-infected C57BL/6 mice were weighted and homogenized in cold PBS. Suspension was then centrifuged at 13000 RPM for 30 min and analyzed for viral detection. Viral titration was also performed on LSEC culture supernatants. Liver suspension and cell culture supernatants were 10-fold serial-diluted and tested for viral presence on L2 cells cultured in 96-well plates. Cytopathic effects (CPE), characterized by syncytia and cell lysis, were recorded at 72 h and virus titers were determined according to Reed-Muench method and expressed as log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>.

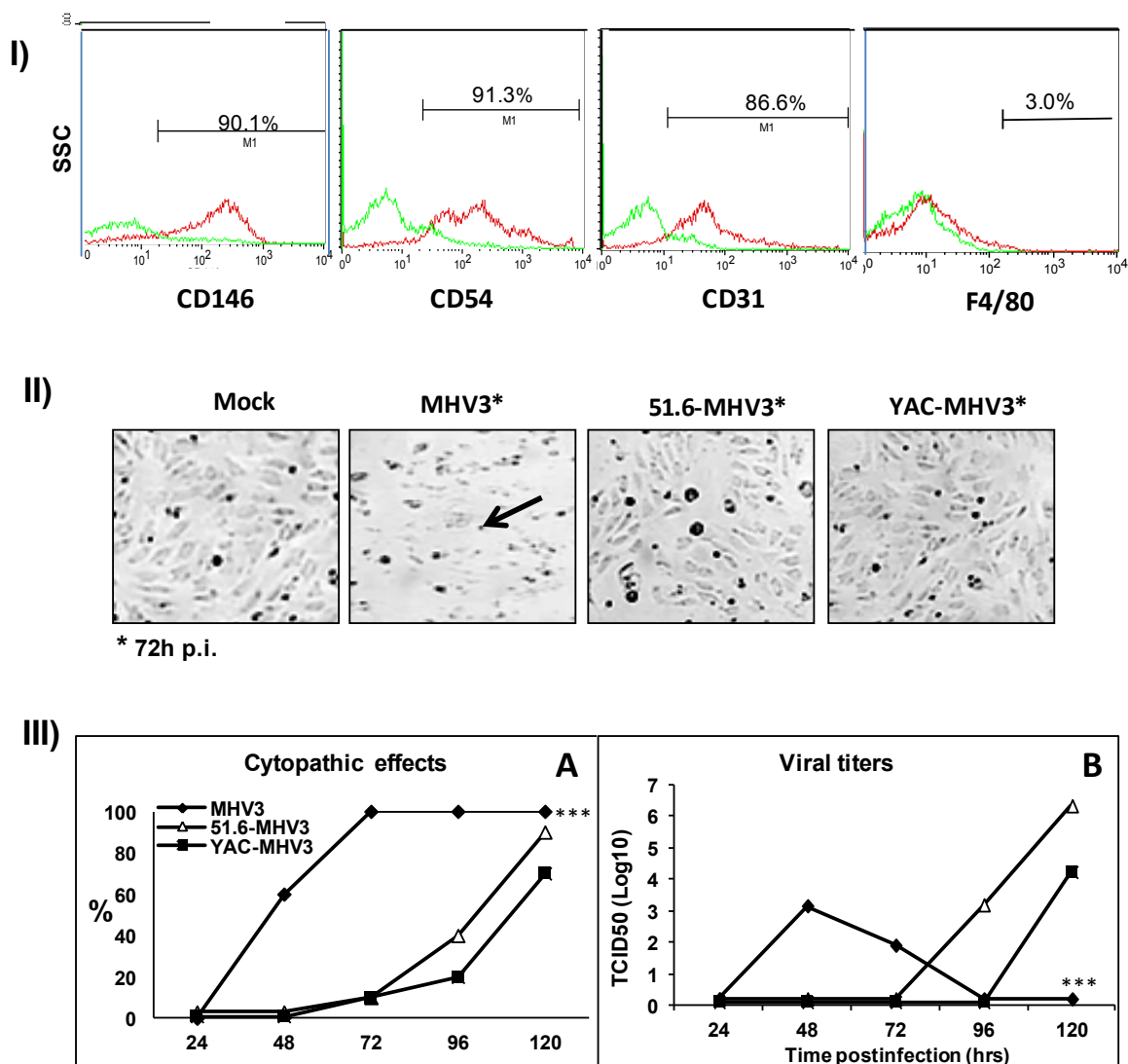
### **3.1.3.12- Statistical analyses**

Data are expressed as means ± the standard error of the mean. Statistical analyses for *in vitro* studies were performed with Student's t-test comparing mock-infected (control) to virus-infected cells, or MHV3-infected to 51.6-MHV3- or YAC-MHV3-infected cells. Multiple group analyses were conducted for *in vivo* studies and data obtained by qPCR, ELISA and viral titration were evaluated by one-way ANOVA test with *posthoc* Tukey test using PASW Statistics software (PASW version 18, IBM SPSS Inc. Chicago, IL). Values of p≤0.05 were considered as significant.

### 3.1.4- Results

#### 3.1.4.1- *In vitro* permissivity of LSECs to hepatotropic or attenuated MHV3 strains replication depends on IFN- $\beta$ production levels

It was already reported that LSECs are permissive *in vitro* to infection by the pathogenic MHV3 but not by the attenuated 51.6-MHV3 variant (Martin *et al.*, 1994). We first aimed to confirm such selective tropism according to MHV3 strains. LSECs were firstly isolated from the liver and purified by Percoll gradient and magnetic sorting using the anti-CD146. Figure 24 section I shows that 87 to 91% of isolated cells expressed CD146, CD54 (ICAM-1), and CD31 (PECAM-1) but not F4/80, which is rather expressed by Kupffer cells (Baratta *et al.*, 2009). Isolated LSECs were then infected with the pathogenic MHV3 or the attenuated 51.6-MHV3 and YAC-MHV3 strains and viral replication was monitored from 24 to 120 h p.i for occurrence of CPE and titration of infectious particles released in cell supernatant. CPE was characterized by cell lysis instead of typical MHV-induced giant syncytial cells. CPE occurred sooner in MHV3-infected LSECs (Fig. 24, sect. II) as cells were totally lysed at 72 h p.i. while CPE in attenuated variant-infected cells were delayed and gradually increased up to 120 h p.i. Correlating with earlier CPE, viral titer in supernatant from MHV3-infected LSEC was detected as soon as 48 h p.i and decreased at 72 h p.i ( $p \leq 0.001$ ) (Fig.24 sect. III) while titers of 51.6- and YAC-MHV3 were detected only after 96 or 120 h p.i.

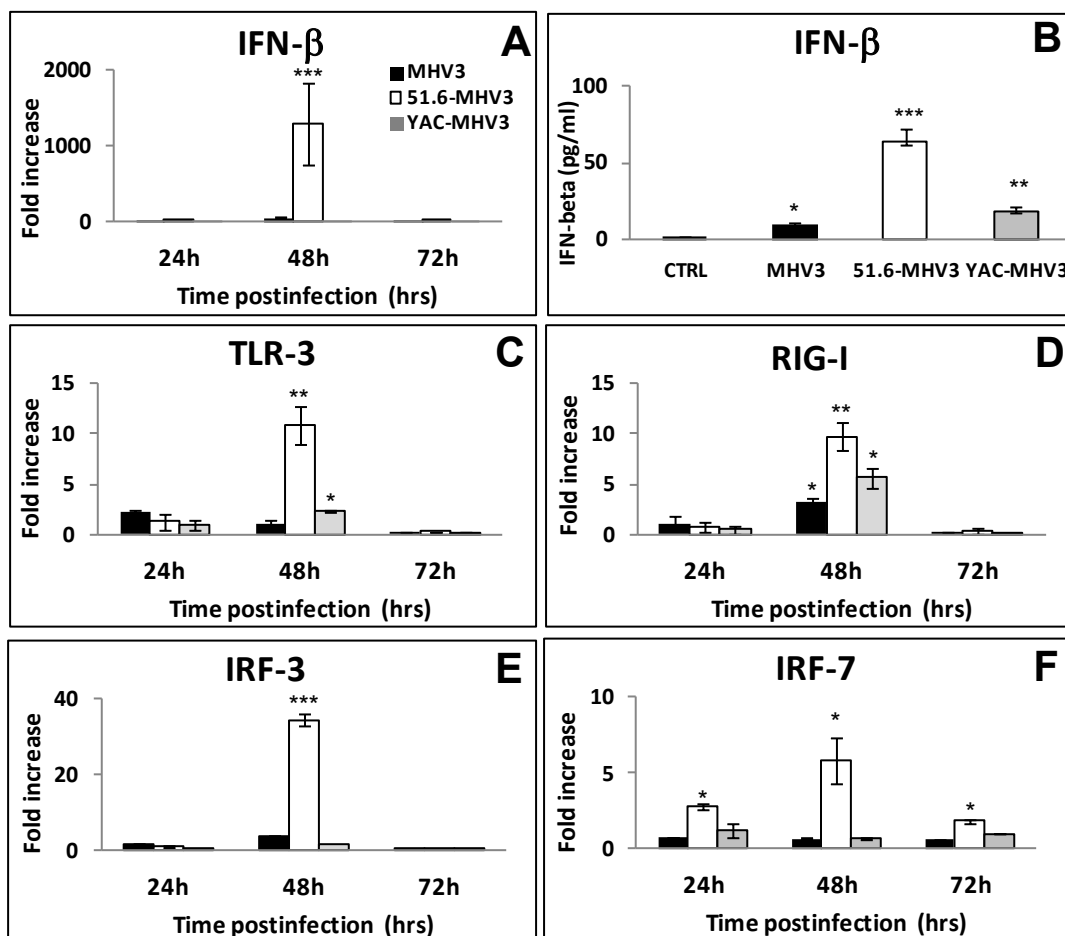


**Figure 7. Highly hepatotropic MHV3 exhibits higher tropism for LSECs than attenuated 51.6-MHV3 and YAC-MHV3.** Mouse LSECs were isolated by Percoll gradient and enriched by magnetic sorting with anti-CD146 antibodies. I. LSECs were characterized by immunolabelling with antibodies for CD146, CD54, CD31 and F4/80 cell markers and cyrofluorometric analysis. II. LSECs were infected with MHV3, MHV-A59 or 51.6-MHV3 at MOI of 0.1. Cytopathic effects (CPE) were evaluated up to 72 h p.i. and were characterized by cell lysis without syncytial cells. III. Kinetics of MHV infections up to 5 days p.i. showing (A) CPE evolution, and (B) viral titers in supernatants of LSECs infected with each viral strain. All experiments were conducted in triplicate. Results are representative of two independent experiments. \*\*\* $P < 0.001$  when comparing MHV3 to 51.6- and YAC-MHV3.



Restricted replication of attenuated MHV3 strains in LSECs does not depend on viral fixation since all three strains share the same viral receptor CEACAM1a expressed on LSECs (Godfraind & Coutelier, 1998; Martin *et al.*, 1994). We hypothesized thus that attenuated MHV3 variants elicited higher antiviral IFN- $\beta$  response than MHV3 in LSECs. mRNA expression and production of IFN- $\beta$  were then evaluated by qRT-PCR and ELISA in infected LSECs. As shown in figure 25A-B, IFN- $\beta$  transcription and production strongly increased in 51.6-MHV3-infected cells at 48 h p.i. ( $p \leq 0.001$ ) while lower levels were induced by YAC-MHV3 ( $p \leq 0.01$ ). The lowest IFN- $\beta$  production occurred in MHV3-infected cells ( $p \leq 0.05$ ), suggesting that higher IFN- $\beta$  response acts as a protective factor for LSECs against MHV3 replication.

It was previously demonstrated that IFN- $\beta$  production by LSECs depends on activation of endosomal TLR-3 and -7 or intracytoplasmic helicase RIG-I activation (Giugliano *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2010). To verify whether higher IFN- $\beta$  production in attenuated MHV3-infected LSECs correlated with higher expression of these viral sensors, mRNA expression levels for TLR3, RIG-I and also for transcription factors IRF-3 and -7 were evaluated by qRT-PCR in LSECs infected with MHV3 and the attenuated strains. Expression levels of TLR-3 and RIG-1 increased in 51.6- and YAC-MHV3- but not in MHV3-infected LSECs at 48 h p.i. ( $p \leq 0.05$  to 0.01)(Figs 25C and D). Only RIG-1 gene was slightly increased by MHV3 infection ( $p \leq 0.05$ ). Expression levels of IRF-3 and IRF-7 gene higher increased in 51.6-MHV3- than MHV3- or YAC-MHV3-infected cells ( $p \leq 0.05$ ) (Figs 25E and F).



**Figure 8. Transcription levels of mRNA for IFN- $\beta$ , TLR-3, RIG-1, IRF-3 and IRF-7 and production of IFN- $\beta$  in *in vitro* MHV3-, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3-infected LSECs.** LSECs were infected at 0.1 MOI of MHV3, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3. At 24, 48 or 72 h p.i., RNA of infected LSECs with each viral strain was extracted and analyzed for (A) IFN- $\beta$ , (C) TLR-3, (D) RIG-1, (E) IRF-3 and (F) IRF-7 mRNA fold changes by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to control cells after normalization with HPRT expression. All samples were run in duplicate. Protein levels of (B) IFN- $\beta$  were quantified by ELISA test at 48 h p.i. in supernatants from LSECs infected with each virus strain. All experiments were conducted in duplicate and results are representative of two independent experiments. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  (infected cells compared to uninfected control cells)

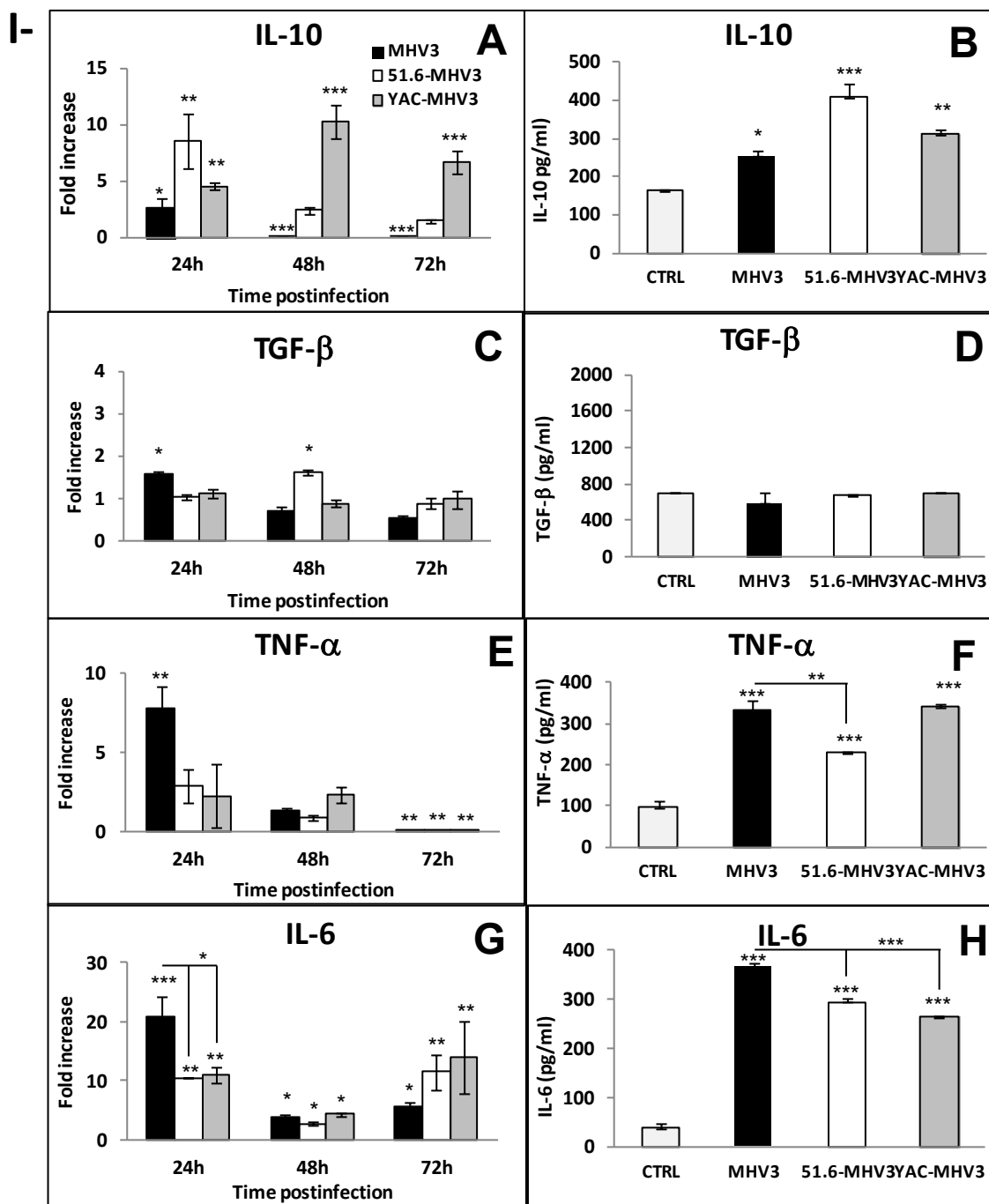
### **3.1.4.2- Attenuated 51.6- or YAC-MHV3 strains favor tolerogenic cytokines production by LSECs while pathogenic MHV3 promotes a predominant pro-inflammatory cytokines and chemokines profile**

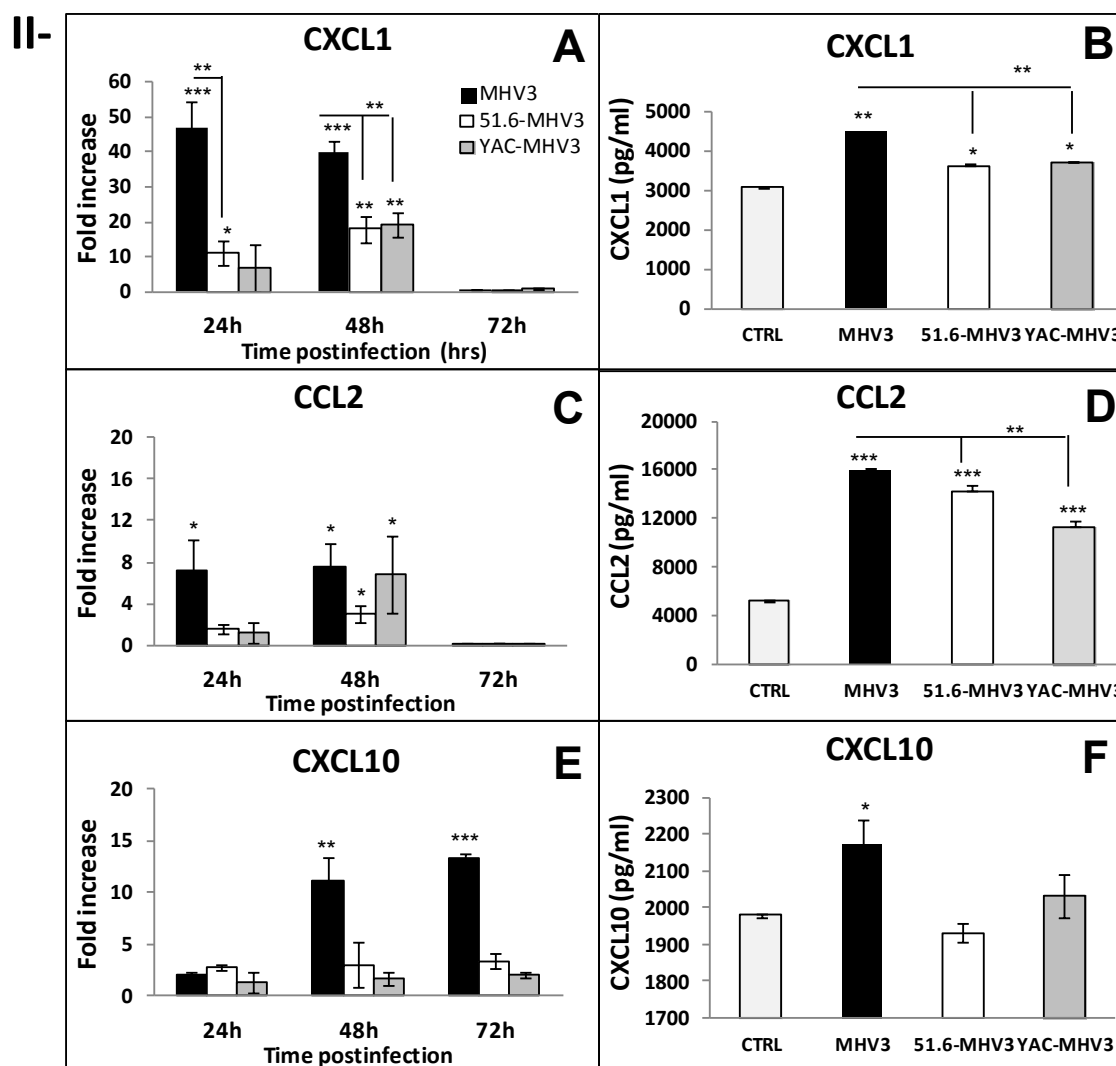
We have previously demonstrated that tolerogenic cytokines, such as IL-10, TGF- $\beta$  and PGE2 (Grewe *et al.*, 1992; Knolle *et al.*, 1995; Bissel *et al.*, 1995) increased in the liver of mice infected with the 51.6- and YAC-MHV3 attenuated variants (Jacques *et al.*, 2008). On the other hand, LSECs can respond to TLRs ligands or cytomegalovirus and produce TNF- $\alpha$  and IL-6 (Wu *et al.*, 2010; Kern *et al.*, 2010) indicating that LSECs may adopt a pro-inflammatory state upon TLR activation and/or viral infection. We speculated that LSECs may switch from a tolerogenic to a proinflammatory phenotype in response to productive infection by the pathogenic MHV3 strain but not by the attenuated variants. To address this hypothesis, mRNA expression levels and production of tolerogenic (IL-10 and TGF- $\beta$ ) and pro-inflammatory (IL-6, TNF- $\alpha$ ) cytokines produced by virally-infected LSECs were determined by qRT-PCR and ELISA assays. As shown in Fig. 26 section I-A and B, IL-10 mRNA expression and production slightly increased at 24 h p.i. in MHV3-infected LSECs but its expression was completely abolished at 48 and 72 h p.i. ( $p \leq 0.001$ ). IL-10 levels rather rapidly or progressively increased in 51.6- and YAC-MHV3-infected cells respectively up to 72 h p.i. ( $p \leq 0.05$  to 0.001). TGF- $\beta$  production, however, was not or low induced in both pathogenic and attenuated MHV3-infected cells ( $p \leq 0.05$ ) (Figs. 26 sect-I-C and D).

TNF- $\alpha$  mRNA levels, however, transiently increased only in MHV3-infected LSECs at 24 h p.i. ( $p \leq 0.01$ ) (Fig. 26 sect. I-E) and were completely inhibited at 72 h p.i. by all MHV3 strains ( $p \leq 0.01$ ). Amounts of TNF- $\alpha$  released in supernatants of infected LSECs, however, increased in all infected cells but remained higher in MHV3 and YAC-MHV3- than 51.6-MHV3-infected cells ( $p \leq 0.001$  when compared to control cells;  $p \leq 0.01$  when compared to MHV3-infected cells) (Fig. 26 sect. I-F). mRNA expression of IL-6 gene reached higher levels in MHV3- than in 51.6- and YAC-MHV3-infected cells at 24 h p.i. only ( $p \leq 0.05$  to 0.001 when compared to control cells ;  $p \leq 0.01$  when compared to MHV3-infected cells ) (Fig. 26 sect. I-G) and correlated with higher release in supernatant of MHV3-infected cells ( $p \leq 0.001$  when

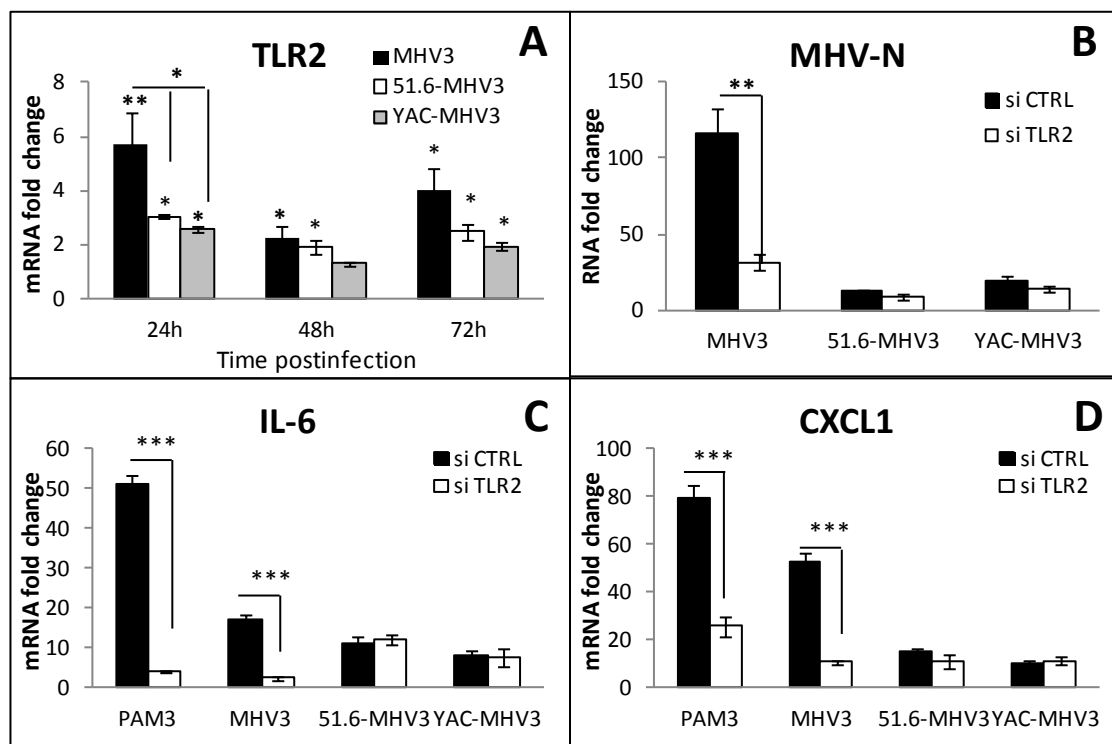
compared to control cells;  $p \leq 0.001$  when compared to MHV3-infected cells)(Fig. 26 sect. I-H).

LSECs were already reported to secrete chemokines upon viral infection and/or to enhance their production in inflammatory liver disease (Connolly *et al.*, 2010; Peyrefitte *et al.*, 2006). To verify whether MHV3-infected LSECs produce higher levels of chemokines, CXCL1, CCL2, and CXCL10 mRNA and production levels were determined by qRT-PCR and ELISA assays. As shown in figure 3, section II-A to D, CXCL1 and CCL2 expression was highly upregulated in MHV3-infected LSECs compared to 51.6- and YAC-MHV3-infected cells at 24 and 48 h p.i. and was reflected by higher protein levels in cell supernatants ( $p \leq 0.05$  to  $0.001$  when compared to control cells;  $p \leq 0.01$  when compared to MHV3-infected cells). CXCL10 gene expression and production levels only increased in MHV3-infected LSECs ( $p \leq 0.05$  to  $0.001$ ) (Fig. 26 sect. II- E and F). We have previously shown that induction of inflammatory cytokines by MHV3 in macrophages depended on TLR2 signaling (Jacques *et al.*, 2009b). TLR2 mRNA expression was upregulated by all viruses but mostly by MHV3 infection at 24 h p.i. ( $p \leq 0.05$  to  $0.01$  when compared to control cells;  $p \leq 0.05$  when compared to the attenuated MHV3-infected cells) (Fig. 27). Knockdown of TLR2 gene expression by siRNA on LSECs prior to infection decreased viral replication (mRNAs of MHV-N) and expression levels of IL-6 and CXCL-1 only in MHV3-infected cells ( $p \leq 0.01$  to  $0.001$ ), suggesting a role for TLR2 in MHV3-induced pro-inflammatory phenotype of LSECs.





**Figure 9. Transcription levels of mRNA for IL-10, TGF- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL1, CCL2 and CXCL10 genes and their production in *in vitro* MHV3-, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3-infected LSECs.** LSECs were infected at 0.1 MOI of MHV3, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3. At 24, 48 or 72 h p.i., RNA and supernatant from LSECs infected with each viral strain were collected. I. (A) IL-10, (C) TGF- $\beta$ , (E) IL-6, and (G) TNF- $\alpha$  mRNA fold changes were analyzed by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to control LSECs after normalization with HPRT expression. All samples were run in duplicate. Production levels of (B) IL-10, (D) TGF- $\beta$ , (F) IL-6, and (H) TNF- $\alpha$  were quantified by ELISA test in supernatants from infected LSECs at 24 h p.i. II. (A) CXCL1, (C) CCL2, and (E) CXCL10 mRNA fold changes were analyzed by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice after normalization with HPRT expression. All samples were run in duplicate. Production levels of (B) CXCL1, (D) CCL2, and (F) CXCL10 were quantified by ELISA test in supernatants from infected LSECs at 24 h p.i. All experiments were conducted in duplicate and results are representative of two independent experiments. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$



**Figure 10. Transcription level of TLR2 in MHV3-, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3-infected LSECs and its role in viral replication and expression of IL-6 and CXCL1.** A) LSECs were infected at 0.1 MOI of MHV3, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3. At 24, 48 or 72 h p.i., RNA from infected LSECs was extracted and mRNA expression levels for TLR2 gene was determined by qRT-PCR. B-D) LSECs were treated with specific siRNA to TLR2 prior to infection for 24h, and (B) MHV nucleoprotein (MHV-N), (C) IL-6, and (D) CXCL1 mRNA expression levels were determined by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice after normalization with HPRT expression. All samples were run in duplicate and results are representative of two independent experiments. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  when compared to control cells or to MHV3-infected cells.

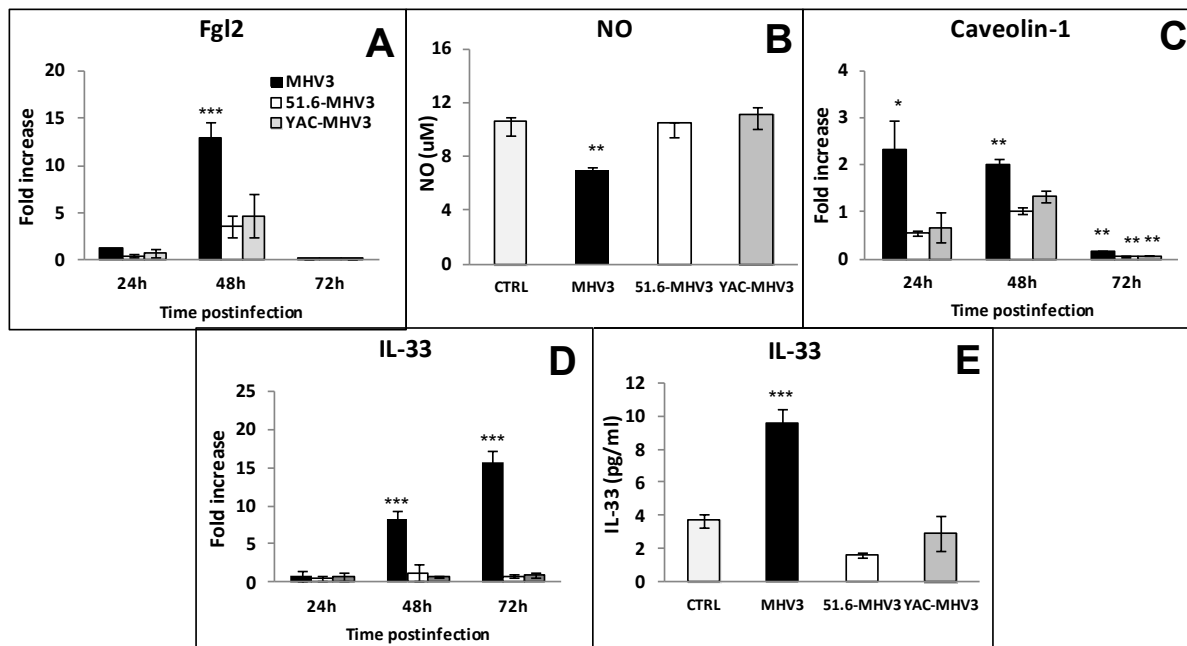
### 3.1.4.3- Attenuated 51.6- and YAC-MHV3 strains do not induce Fgl2, caveolin-1 and IL-33 expression neither alter production of NO, as seen in pathogenic MHV3-infected LSECs

Previous studies have demonstrated that MHV3-induced fulminant hepatitis correlates with Fgl-2 production by LSECs, a prothrombinase promoting vascular thrombosis and hepatic inflammation (Ding *et al.*, 1997; Ning *et al.*, 1999). In addition, MHV3 replication in macrophages was shown to be controlled by nitric oxide (NO) (Pope *et al.*, 1998), a

vasodilator factor produced by endothelial cells (reviewed in Oda *et al.*, 2003). In agreement with vascular disorders induced during *in vivo* MHV3 infection, we propose that infection with attenuated MHV3 variants do not disturb the vascular functions of LSECs. To verify that, expression level of Fgl-2 and quantification of NO in culture supernatants were evaluated in infected LSECs. As shown in the figure 28A, Fgl2 gene expression significantly increased only in MHV3-infected cells at 48 h p.i. ( $p \leq 0.001$ ). The lower levels at 72 h p.i. in MHV3-infected culture ( $p \leq 0.05$ ) reflected total cell lysis. Release of NO was reduced only in MHV3- but not in 51.6- or YAC-MHV3-infected cells ( $p \leq 0.01$ ) (Fig. 28B). Since production of NO by LSECs is negatively regulated by CAV-1 that inhibits endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity (Kwok *et al.*, 2009), we hypothesized that infection by pathogenic MHV3 but not its attenuated variants increases CAV-1 expression in LSECs. As shown in figure 28C, mRNA expression level for CAV-1 gene increased only in MHV3-infected LSECs at 24 and 48 h p.i. ( $p \leq 0.05$  to 0.01). Lower levels in CAV-1 expression at 72 h p.i. ( $p \leq 0.01$ ) may result from high CPE in MHV3-infected cells and/or blockade of CAV-1 transcription in cells infected with the attenuated viruses.

MHV3-induced fulminant hepatitis has been recently associated with an increase of IL-33, an alarmin secreted mainly by injured LSECs and hepatocytes (Arshad *et al.*, 2013). We postulated thus that delayed infection of LSECs by attenuated variants did not increase expression of IL-33 in contrast to pathogenic MHV3 infection. As shown in figures 28D and E, gene expression and release of IL-33 only increased in MHV3-infected cells ( $p \leq 0.001$ ).





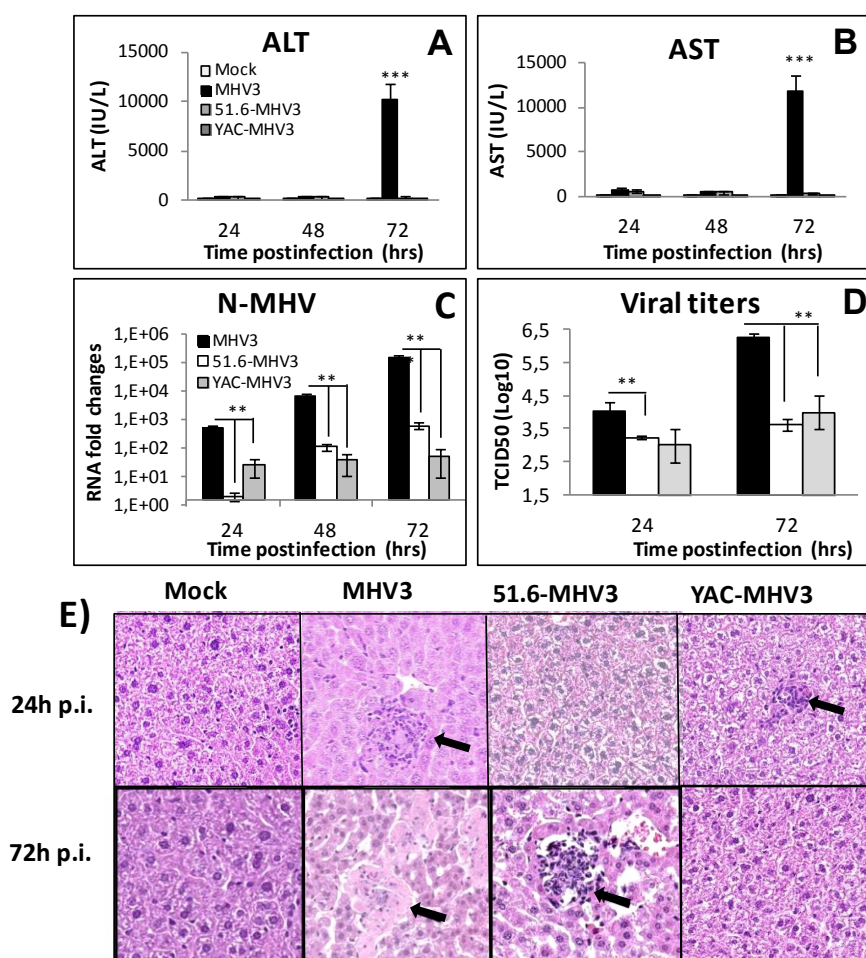
**Figure 11. Transcription levels of mRNA for Fgl2, IL-33 and caveolin-1, and production of NO and IL-33 in *in vitro* MHV3-, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3-infected LSECs.** LSECs were infected at 0.1 MOI of MHV3, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3. At 24, 48 or 72 h p.i., RNA and supernatant from LSECs infected with each viral strain were collected. (A) Fgl-2, (C) caveolin-1, and (D) IL-33 mRNA fold changes were analyzed by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to control LSECs after normalization with HPRT expression. All samples were run in duplicate. (B) NO levels were quantified by the Griess reaction, and (E) production levels of IL-33 were quantified by ELISA test in supernatants from infected LSECs at 48 h p.i. All experiments were conducted in duplicate and results are representative of two independent experiments. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$

#### 3.1.4.4- Lower permissivity of LSECs to attenuated MHV3 variant replication correlates with reduced hepatic damages and viral replication in liver

To unravel the *in vivo* effects of lower permissivity of LSECs to infection by the attenuated MHV3 variants on the evolution of hepatitis, C57BL/6 mice were i.p. infected with MHV3 or the attenuated viruses for 24 to 72 h p.i., and blood and livers were collected for clinical, histopathology and viral titer analyses. As shown in figures 29A and B, blood levels of transaminases ALT et AST increased only in MHV3-infected mice at 72 h p.i. ( $p \leq 0.001$ ) indicating no or low hepatic damages in livers from attenuated 51.6- and YAC-MHV3-

infected mice. Higher viral replication occurred rapidly in the liver of MHV3-infected mice, as determined by the expression of the viral nucleoprotein RNA (RT-qPCR) and viral titers ( $p \leq 0.01$  to  $0.001$ ) (Figs 29 C and D).

Histopathology of the liver from MHV3-infected mice revealed few inflammatory foci surrounding necrotic cells at 24 h p.i. which almost disappeared at 72 h p.i. when hepatocyte necrosis became extensive (Fig. 29E). Infection with 51.6-MHV3 revealed inflammatory foci only at 72 h p.i. with progressive hepatic damage from 48 to 72 h p.i. while YAC-MHV3 induced few small inflammatory infiltrates as soon as 24 h p.i. with no observable hepatic necrosis even at 72 h p.i. (Fig. 29E and F). These results indicate that MHV3 tropism for LSECs is an important aggravating factor of hepatic lesions and MHV3 replication in the liver.



**F)**

Virus	Time p.i. (hrs)	Inflammatory foci	Hepatic necrosis foci
MHV3	24	+	-
	48	++	++
	72	+	++++
51.6-MHV3	24	-	-
	48	-	+
	72	++	++
YAC-MHV3	24	+	-
	48	+	-
	72	+	-

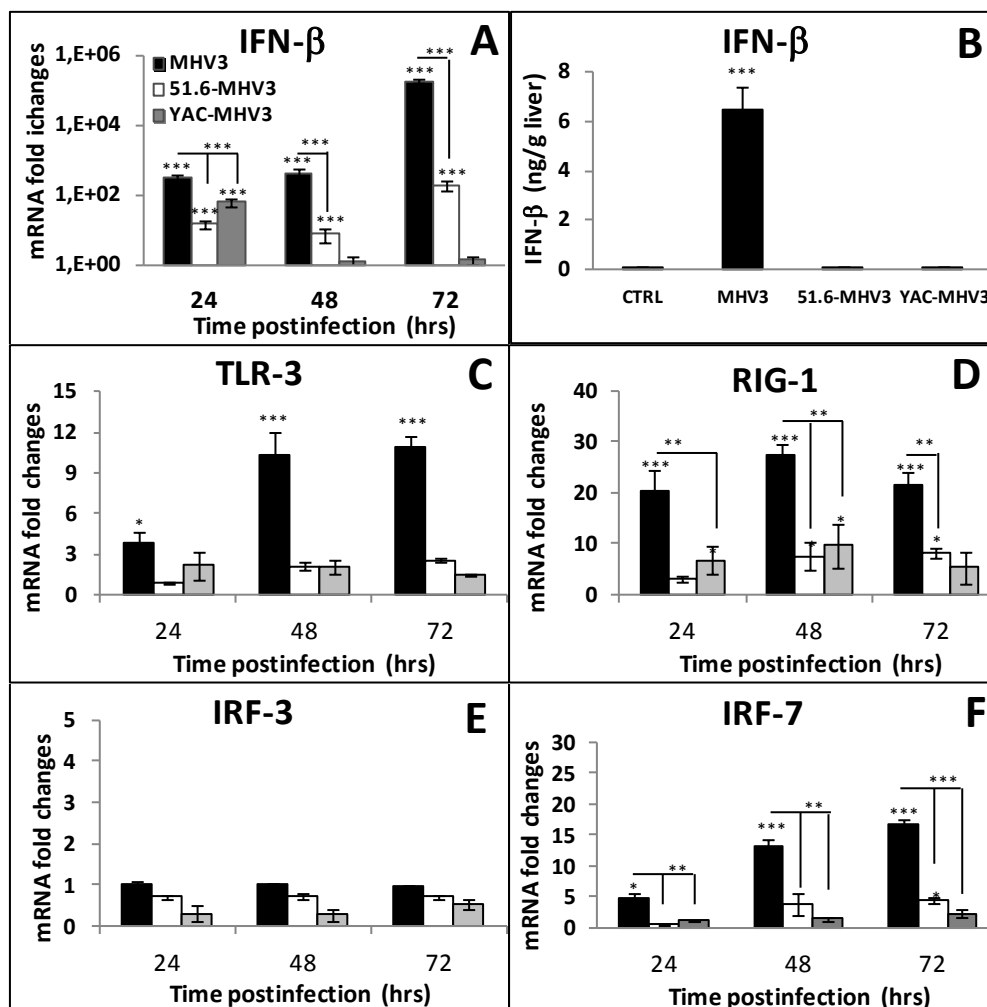
+ (scarce foci); ++ (10% of hepatic tissue); +++ (20-30% of hepatic tissue); ++++ ( up to 40% of hepatic tissue)

**Figure 12. Hepatic damages and viral replication in highly hepatotropic MHV3- and attenuated 51.6- and YAC-MHV3-infected mice.** Groups of 5 or 6 C57BL/6 were intraperitoneally infected with 1000 TCID<sub>50</sub> (tissue culture infective dose 50%) of MHV3, 51.6-MHV3 or YAC-MHV3. Serum samples from mock- and MHV3-, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3-infected mice were assayed for (A) ALT and (B) AST activities at 24, 48 and 72 h p.i. MHV3 replication in livers from each group of infected mice was determined by (C) analysis of the nucleoprotein (NP) RNA expression at 24, 48 and 72 h p.i. by RT-qPCR, and (D) by viral titration (TCID<sub>50</sub>) at 24 h and 72 h p.i. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice after normalization with HPRT expression. (E) Histopathological analysis was conducted on livers from mock- and viral-infected mice from each group at 24 and 72 h p.i. (F) Occurrence of inflammatory and hepatic necrosis foci in the liver of MHV3-, 51.6-MHV3- and YAC-MHV3-infected mice at 24, 48 and 72 h p.i. \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001 when compared to MHV3-infected mice.

### **3.1.4.5- IFN- $\beta$ production levels are not protective but rather reflect the gravity of hepatitis induced by MHV3 viruses**

We next aimed to determine whether the lower replication of 51.6- and YAC-MHV3 in the liver was associated with higher induction of the antiviral type I IFN pathway as observed in *in vitro* infected LSECs (see Figs 25 A and B). To verify whether IFN- $\beta$  levels increased throughout the infection with attenuated MHV3 variants, IFN- $\beta$  mRNA expression and production were evaluated in the liver from all groups of infected mice. As shown in Fig. 30A, gene expression of IFN- $\beta$  higher increased in MHV3-infected mice and was sustained up to 72 h p.i. while it was delayed or lowered in 51.6- and YAC-MHV3 infections respectively ( $p \leq 0.001$  when to mock-infected mice;  $p \leq 0.001$  when compared to MHV3-infected mice). Quantification of IFN- $\beta$  by ELISA in the liver at 72h p.i. confirmed higher production of IFN- $\beta$  in MHV3-infected mice ( $p \leq 0.001$ ) (Fig. 30B).

The expression of TLR-3 and RIG-I in the liver, which are involved in IFN- $\beta$  production in *in vitro* infected LSECs, was earlier and higher induced in MHV3- than 51.6- and YAC-MHV3-infected mice ( $p \leq 0.05$  to  $0.001$  when compared to mock-infected mice) (Figs 30 C and D). Accordingly, a higher mRNA expression of IRF-7 occurred in mice infected with MHV3 (Fig. 30F) ( $p \leq 0.05$  and  $0.001$  when compared to mock-infected mice;  $p \leq 0.01$  and  $0.001$  when compared to MHV3-infected mice).



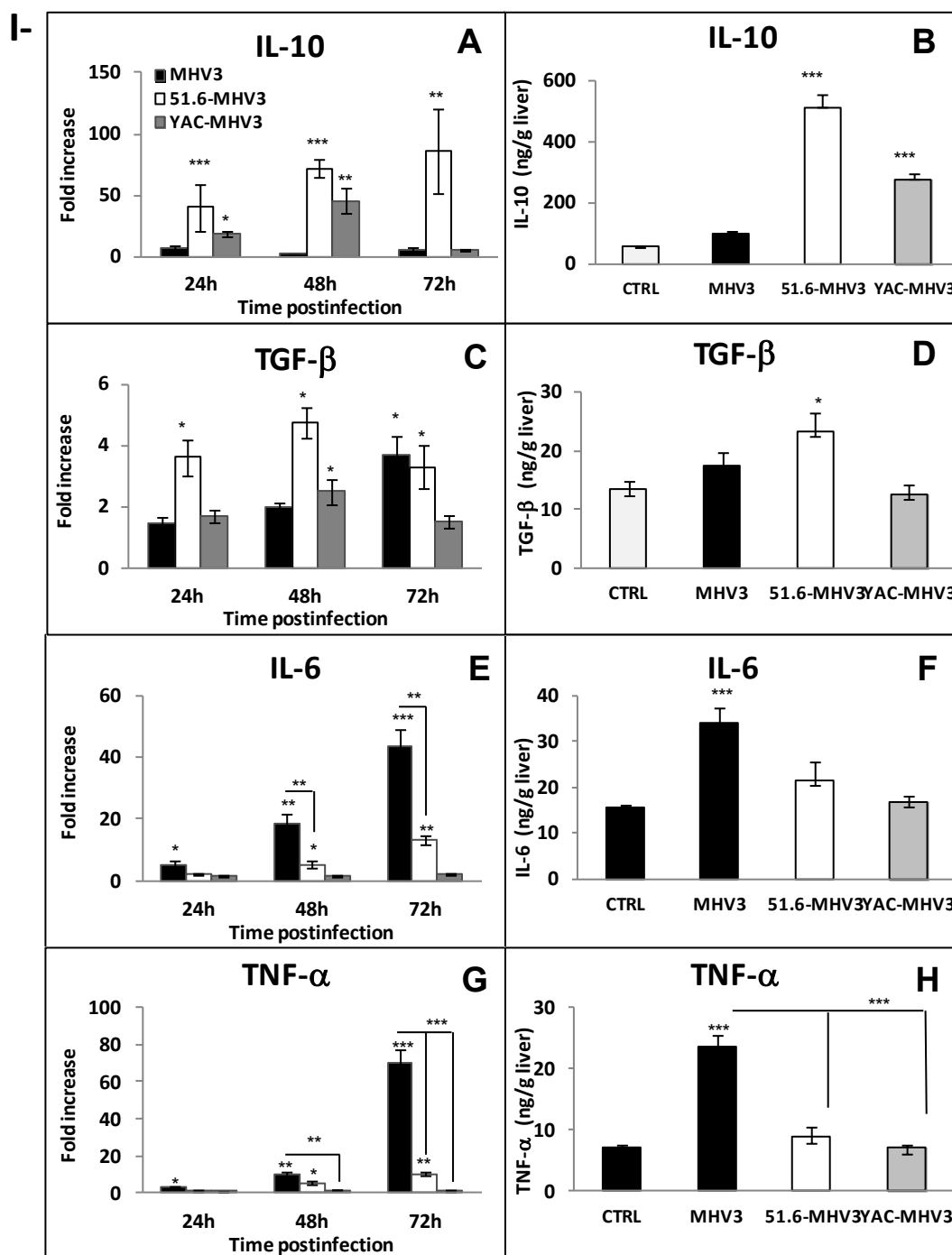
**Figure 13. Transcription levels of mRNA for IFN- $\beta$ , TLR-3, RIG-1, IRF-3 and IRF-7 and production of IFN- $\beta$  in the liver of MHV3-, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3 infected mice.** Groups of 5 or 6 C57BL/6 mice were intraperitoneally infected with 1000 TCID<sub>50</sub> (tissue culture infective dose 50%) of MHV3, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3. At 24, 48 or 72 h p.i., livers were collected from mock- and viral-infected mice from each group and (A) IFN- $\beta$ , (C) TLR-3, (D) RIG-1, (E) IRF-3 and (F) IRF-7 mRNA fold changes were analyzed by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice after normalization with HPRT expression. Samples from each mouse were run in duplicate. Protein levels of (B) IFN- $\beta$  were quantified by ELISA test at 72 h p.i. in the liver of each mouse. \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$  when compared to mock-infected mice or MHV3-infected mice.

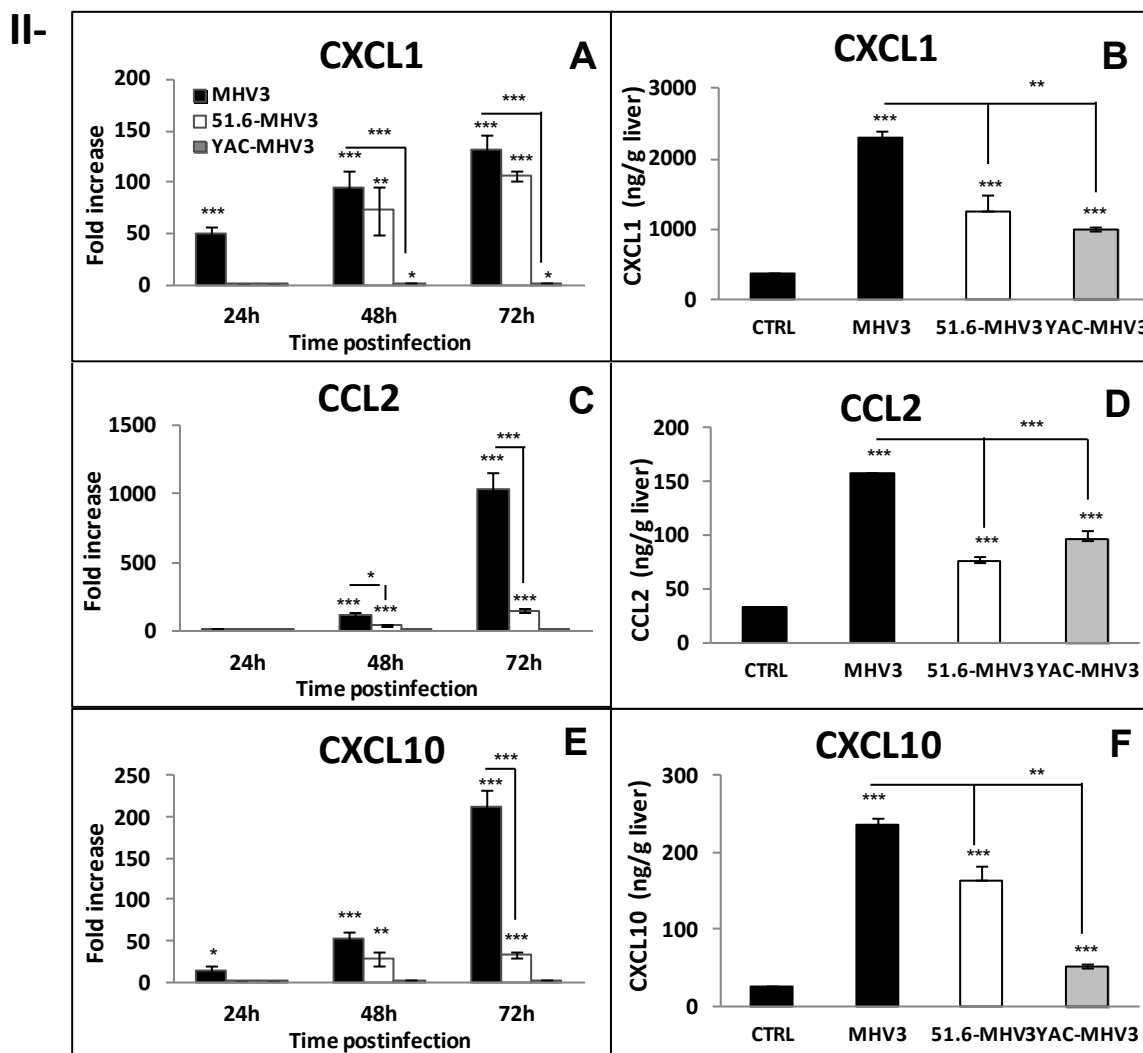
### 3.1.4.6- MHV3 infection of LSECs promotes a predominant inflammatory over tolerogenic state in the liver exacerbating hepatic inflammation during acute hepatitis

The differences in hepatic damage levels caused by pathogenic and attenuated MHV3 strains may result from an imbalance in tolerogenic/inflammatory cytokines, as observed in *in vitro* infected LSECs (see Fig. 26). To verify this hypothesis, levels of tolerogenic (IL-10 and TGF- $\beta$ ) and pro-inflammatory (IL-6, TNF- $\alpha$ ) cytokines were determined by qRT-PCR (from 24 to 72 h p.i.) and ELISA (72 h p.i.) assays in the liver of all groups of infected mice. As indicated in the figure 31, section I-A and B, mRNA expression and production of IL-10 were highly induced in the liver of 51.6- and YAC-MHV3-infected mice but not in MHV3-infected mice ( $p \leq 0.05$  to 0.001). Similarly, TGF- $\beta$  mRNA levels were highly induced in the liver of 51.6-MHV3-infected mice, especially at 24 and 48 h p.i. while they only increased at 72 h p.i. in the liver of MHV3-infected mice ( $p \leq 0.05$ )(Fig. 31 , section I-C and D). On the other hand, mRNA expression and production levels of intrahepatic IL-6 were highly up-regulated in MHV3-infected mice and, at a lesser extent, by 51.6-MHV3 infection while no induction was noted in YAC-MHV3-infected mice ( $p \leq 0.05$  and 0.001 when compared to mock-infected mice;  $p \leq 0.01$  when compared to MHV3-infected mice) (Fig. 31, sect. I E-F). The production of TNF- $\alpha$  increased mainly in the liver of MHV3-infected mice while it remained low in mice infected with the attenuated strains ( $p \leq 0.05$  and 0.001 when compared to mock-infected mice;  $p \leq 0.01$  when compared to MHV3-infected mice) (Fig. 31 sect. I G-H).

Loss of tolerogenic status in the liver is accompanied by chemokine production responsible for leucocyte attraction at inflammatory sites (reviewed in Zeremski *et al.*, 2007). As higher release of chemokines was induced by the pathogenic MHV3 infection in *in vitro* infected LSECs, (see Fig. 26, section II), we can postulate that chemokines may also be induced more potently by MHV3 than attenuated strains in the liver. As shown in figure 31, section II- A and B, mRNA and protein levels of CXCL1 rapidly increased in MHV3-infected mice while they were delayed or lowered in 51.6- and YAC-MHV3-infected mice, respectively ( $p \leq 0.05$  to 0.001 when compared to mock-infected mice;  $p \leq 0.01$  and 0.001 when compared to

MHV3-infected mice). CCL2 and CXCL10 transcription and production levels increased throughout infection by MHV3 but were dramatically reduced in 51.6- or YAC-MHV3-infected mice ( $p \leq 0.01$  or  $0.001$  when compared to mock-infected mice;  $p \leq 0.05$  or  $0.001$  when compared to MHV3-infected mice) (Fig. 31, section II- C to F).



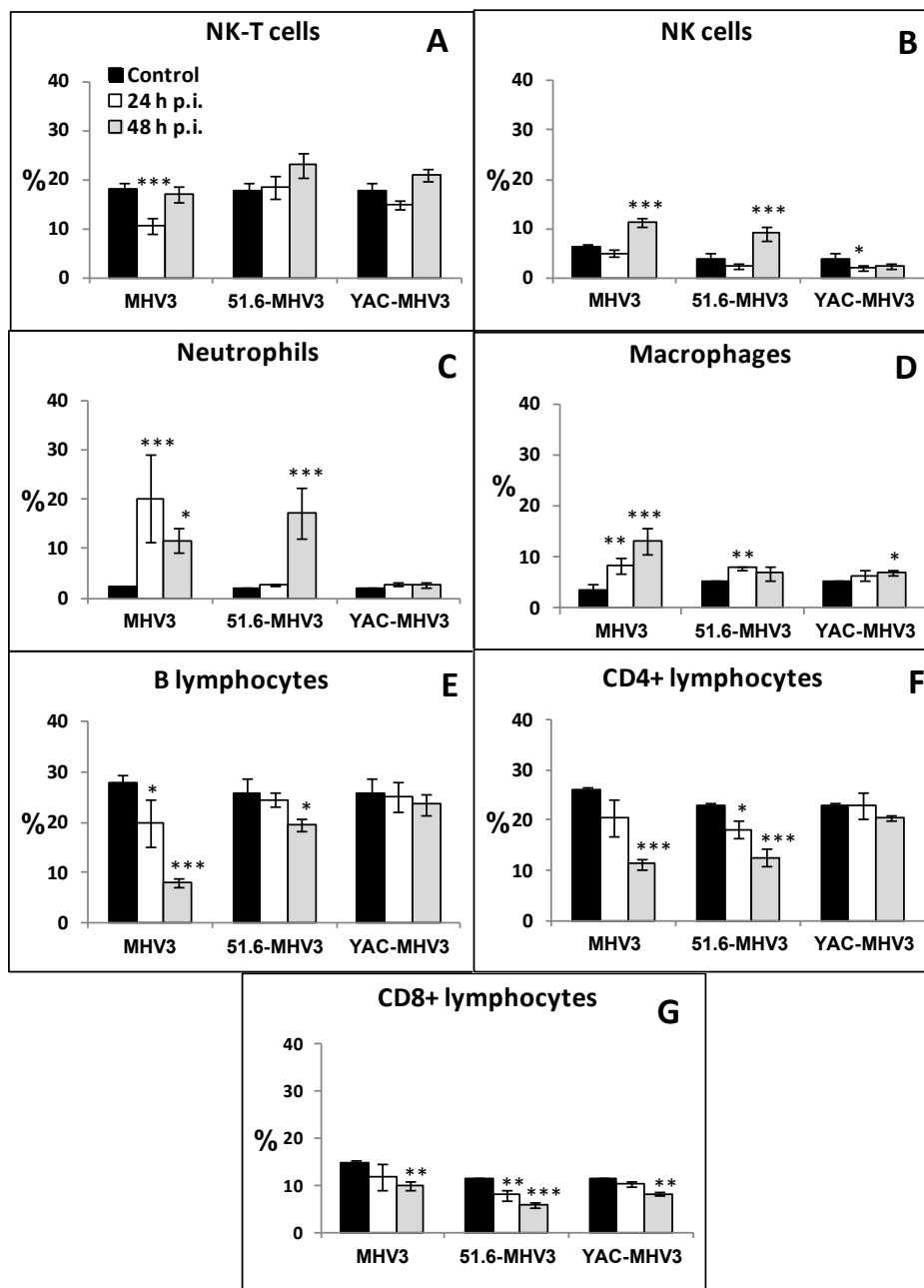


**Figure 14.** Transcription levels of mRNA for IL-10, TGF- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL1, CCL2 and CXCL10 genes and their production in the liver of MHV3-, 51.6-MHV3- and YAC-MHV3-infected mice. Groups of 5 or 6 C57BL/6 mice were intraperitoneally infected with 1000 TCID<sub>50</sub> (tissue culture infective dose 50%) of MHV3, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3. At 24, 48 or 72 h p.i., livers were collected from mock- and viral-infected mice of each group. Section I: (A) IL-10, (C) TGF- $\beta$ , (E) IL-6, and (G) TNF- $\alpha$  mRNA fold changes were analyzed by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice after normalization with HPRT expression. Production levels of (B) IL-10, (D) TGF- $\beta$ , (F) IL-6, and (H) TNF- $\alpha$  were quantified by ELISA test at 72 h p.i. in the liver of each mouse. Section II: (A) CXCL1, (C) CCL2, and (E) CXCL10 mRNA fold changes were analyzed by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice after normalization with HPRT expression. Production levels of (B) CXCL1, (D) CCL2, and (F) CXCL10 were quantified by ELISA test at 72 h p.i. in the liver of each mouse. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  when compared to mock-infected mice or MHV3-infected mice.



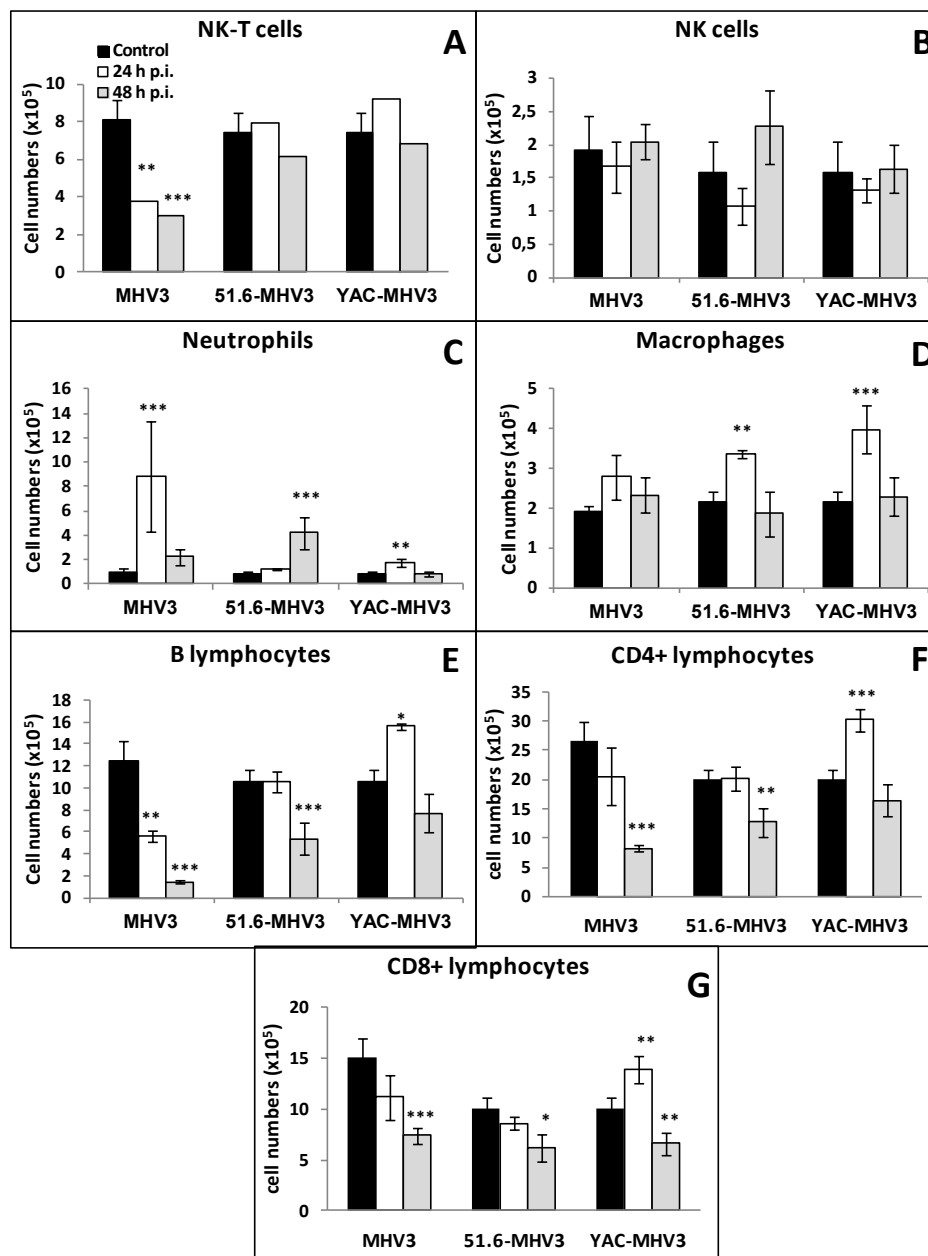
### 3.1.4.7- Loss of liver tolerance induced by pathogenic MHV3 but not the attenuated 51.6 and YAC-MHV3 variants leads to rapid and higher hepatic recruitment of inflammatory neutrophils and severe impairment of NKT, B, and T cells

LSECs are responsible for the recruitment and transmigration of leucocytes during liver inflammation (Neumann *et al.*, 2015). We postulated that higher production of chemokines in the liver of MHV3-infected mice resulted in higher recruitment of inflammatory cells when compared with the attenuated virus strains. Such hypothesis was also supported by differences in number and occurrence time of inflammatory foci between groups of infected mice (see Fig. 29E). To determine leukocyte subsets recruited in the liver, intrahepatic mononuclear cells were isolated at 24 and 48 h p.i. from all groups of mice, immunolabelled, and the percentages of NKT (NK1.1+CD3+) and NK (NK1.1+CD3-) cells, neutrophils (CD11b<sup>hi</sup>Gr1<sup>hi</sup>), macrophages (CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>int</sup>), B (CD19+) and T (CD8+ and CD4+) cells were analyzed by cytometry and compared to cells from mock-infected mice. As shown in figures 32A and B (supplemental data), percentages of NKT cells transiently decreased in the liver of MHV3-infected mice ( $p \leq 0.001$ ). NK cell percentages increased in MHV3- and 51.6-MHV3-infected mice while they decreased in YAC-MHV3-infected animals ( $p \leq 0.05$  and  $0.001$ ). Neutrophils, however, were earlier but only transiently recruited in the liver of MHV3-infected mice when compared to 51.6-MHV3 infection ( $p \leq 0.05$  and  $0.001$ ) (Fig. 32C). Percentages of intrahepatic macrophages increased more in MHV3-infected mice ( $p \leq 0.05$  to  $0.001$ ) (Fig. 32D). Regarding lymphocyte subsets, B cell percentages decreased mainly in the liver of MHV3-infected mice ( $p \leq 0.05$  to  $0.001$ ) (Fig. 32E) and CD4+ and CD8+ cells were reduced in both MHV3- and 51.6-MHV3-infected mice ( $p \leq 0.05$  and  $0.001$ ) while only CD8+ cells were affected by YAC-MHV3 ( $p \leq 0.01$ ) (Figs 32F and G).



**Figure 15. Percentages of intrahepatic mononuclear cell subsets in livers from MHV3-, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3-infected mice.** Intrahepatic mononuclear cells were isolated from groups of 5 or 6 mock-infected or MHV3-, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3-infected C57BL/6 mice at 24 and 48 h p.i., immunolabelled with NK1.1, CD3, Gr1, CD11b, CD19, CD4 and CD8 monoclonal antibodies and analyzed by cytofluorometry. Percentages of (A) NKT (NK1.1+CD3+), (B) NK (NK1.1+CD3-), (C) neutrophils (Gr1<sup>hi</sup> CD11b<sup>hi</sup>), (D) macrophages (Gr1<sup>+</sup> CD11b<sup>int</sup>) cells, (E) (CD19+), (F) CD4 (CD3+CD4+ ) and (G) CD8 (CD3+CD8+) were evaluated in livers from each group of infected mice and compared to mock-infected mice (control). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$

Since a substantial decrease in total number of isolated intrahepatic cells was noted over infection time with MHV3 only, the analysis of absolute numbers of each cell subset better reflects the recruitment of inflammatory cells. Cell numbers were then determined, using the percentage of each subset reported to total number of isolated cells in the liver of each mice. As shown in figures 33 A and B, NK-T cells decreased only in the liver of MHV3-infected mice ( $p \leq 0.01$  and  $0.001$ ) while total NK cells were not altered in all infected groups. Number of neutrophils, however, increased as soon as 24 h p.i. in MHV3-infected mice and were delayed or lower recruited in livers from 51.6- and YAC-MHV3-infected mice respectively ( $p \leq 0.01$  and  $0.001$ ) (Fig. 33C). In contrast to that observed with percentages, numbers of intrahepatic macrophages increased in the liver of mice infected with attenuated YAC- and 51.6-MHV3 strains ( $p \leq 0.01$  and  $0.001$ ) but not with MHV3 (Fig. 33D). The numbers of B and T (CD4 and CD8) cells were also dramatically impaired over the course of infection by MHV3, but were less altered by 51.6-MHV3 infection or transiently increased at 24 h p.i. in YAC-MHV3-infected mice ( $p \leq 0.05$  to  $0.001$ ) (Figs. 33E, F and G).



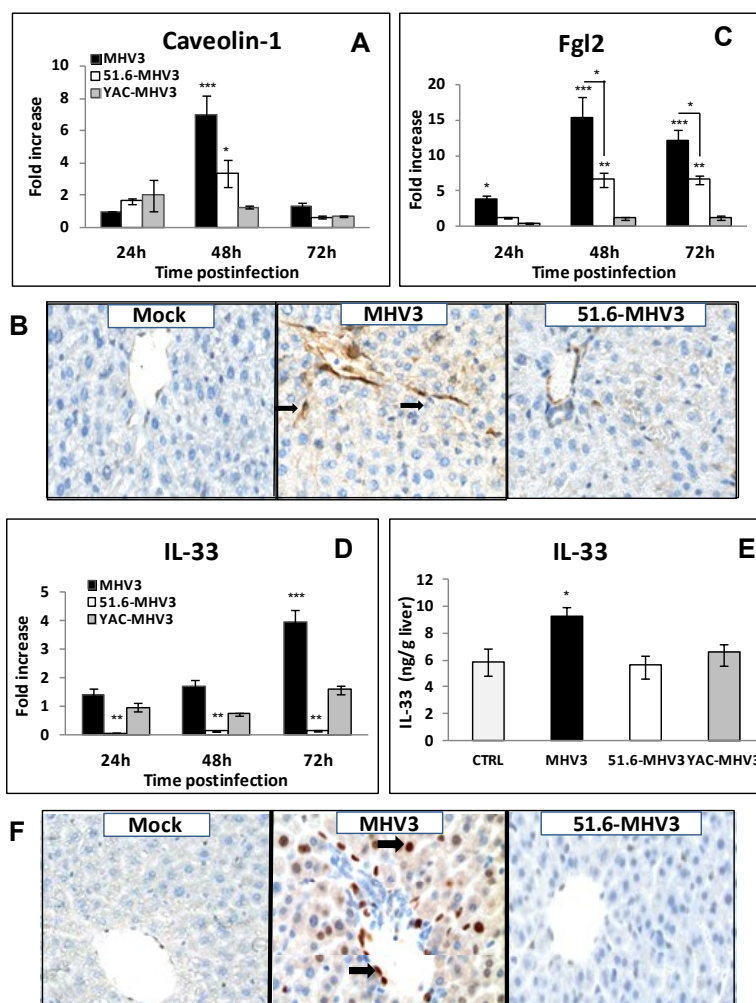
**Figure 16. Numbers of intrahepatic mononuclear cell subsets in livers from MHV3-, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3-infected mice.** Intrahepatic mononuclear cells were isolated from groups of 5 or 6 mock-infected or MHV3-, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3-infected C57BL/6 mice at 24 and 48 h p.i., immunolabeled with NK1.1, CD3, Gr1, CD11b, CD19, CD4 and CD8 monoclonal antibodies and analyzed by cytofluorometry. Absolute numbers for each cell subset were calculated in using respective percentages reported to total number of isolated mononuclear cells in livers of respective groups. Absolute numbers of (A) NKT (NK1.1+CD3+), (B) NK (NK1.1+CD3-), (C) neutrophils (Gr1<sup>hi</sup> CD11b<sup>hi</sup>), (D) macrophages (Gr1<sup>+</sup> CD11b<sup>int</sup>) cells, (E) (CD19+), (F) CD4 (CD3+CD4+) and (G) CD8 (CD3+CD8+) were evaluated in livers from each group of infected mice and compared to mock-infected mice (control). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

#### 3.1.4.8- Expression levels of caveolin-1, Fgl2- and IL-33 in the liver of infected mice correlates with tropism of MHV3 strains for LSECs

The vascular functions of LSECs were reported to be disturbed during MHV3 infection (Ding *et al.*, 1997; Arshad *et al.*, 2013). As shown in figure 28 above, disorders in CAV-1 and Fgl2 expression levels as well as NO release were only observed *in vitro* MHV3-infected LSECs. In order to verify whether endothelial vascular dysfunctions also occurred *in vivo* in MHV3-infected mice, mRNA levels for CAV-1 and Fgl2 were quantified by qRT-PCR in livers from all infected groups of mice. Intrahepatic expression of CAV-1 was also localized by immunohistochemistry staining in MHV3 and 51.6-MHV3-infected mice. As shown in figure 34A, higher increase of CAV-1 mRNA levels were observed at 48 h p.i. in the liver of MHV3-infected mice while lower or no induction was noted in 51.6- and YAC-MHV3-infected mice, respectively ( $p \leq 0.05$  and  $0.001$  when compared to mock-infected mice). Immunolocalization of CAV-1 revealed specific expression in LSECs and higher induction in the liver of MHV3- than 51.6-MHV3-infected mice (see black arrows, Fig. 34B). Gene expression of Fgl2 increased as soon as 24 h p.i. in mice infected with MHV3 while it was delayed and lower in 51.6-MHV3 infection or not induced in YAC-MHV3-infected mice ( $p \leq 0.05$  to  $0.001$  when compared to mock-infected mice ;  $p \leq 0.05$  when compared to MHV3-infected mice) (Fig. 34C).

We have observed above that IL-33 increased only in *in vitro* MHV3-infected LSECs (Fig. 28). To determine whether IL-33 was also specifically induced *in vivo* in MHV3-infected mice, mRNA expression, production and localization of IL-33 were assayed by qRT-PCR, ELISA and IHC, respectively, in livers from all infected groups of mice. As shown in figure 34D, gene expression of IL-33 increased only in the liver of MHV3-infected mice ( $p \leq 0.001$ ) while it was rather inhibited in mice infected with 51.6-MHV3 ( $p \leq 0.01$ ). IHC staining confirmed that IL-33 was only induced in the liver of MHV3-infected mice and mostly expressed in LSECs, and at a lesser extent in hepatocytes nuclei, found around necrotic foci (Fig. 34F).

Taken together, these results strengthen the importance of LSEC-mediated tolerogenic/inflammatory balance during acute viral hepatitis to limit liver injury related to harmful viral-induced inflammatory response.



**Figure 17. Transcription and/or expression of Caveolin-1, Fgl2 and IL-33 in the liver of MHV3-, 51.6-MHV3- and YAC-MHV3-infected mice.** Groups of 5 or 6 C57BL/6 (WT) were intraperitoneally infected with 1000 TCID<sub>50</sub> (tissue culture infective dose 50%) of MHV3, 51.6-MHV3 and YAC-MHV3. At 24, 48 or 72 h.p.i., livers were collected from mock- and virally-infected mice of each group. mRNA expression for (A) caveolin -1, (C) Fgl-2, and (D) IL-33 genes was evaluated by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice after normalization with HPRT expression. (B) *In situ* expression of caveolin-1 and (F) IL-33 were determined by immunohistochemistry in livers of mock-, MHV3- and 51.6-MHV3-infected mice at 48 h p.i.. Production levels of (E) IL-33 were quantified by ELISA test at 72 h p.i. in the liver of each mouse. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  when compared to mock-infected mice or to MHV3-infected mice.

### 3.1.5- Discussion

In this work, we have confirmed that LSECs are permissive *in vitro* to a rapid and productive replication of the highly hepatotropic MHV3 whereas they supported delayed replication of attenuated 51.6-MHV3 and YAC-MHV3 variants. MHV3 infection of LSECs involved higher production of inflammatory cytokines and chemokines, Fgl-2, alarmin IL-33 and CAV-1 simultaneously with decrease of NO and IL-10 in contrast with that observed in attenuated 51.6- and YAC-MHV3-infected LSECs. These results indicate that rapid MHV3 replication in LSECs reverts *in vitro* their tolerogenic functions towards an inflammatory profile. Such reversion was reflected *in vivo* by aggravated hepatitis outcome associated with higher viral replication and production of inflammatory mediators in MHV3- than LSECs-restricted 51.6 and YAC-MHV3-infected mice.

LSECs, KC and stellate cells, lining the hepatic sinusoids, are firstly responsible for tolerogenic properties of the liver (reviewed in Tiegs & Lohse, 2010) but given their anatomical situation, they are also the first to interact with hepatotropic viruses. In this work, we have demonstrated for the first time that MHV3 tropism for LSECs is an important aggravating factor of hepatic damages, viral replication, and exacerbated liver inflammatory response. The permissivity of LSECs to highly hepatotropic MHV3 was supported by rapid viral replication and CPE in *in vitro* infected cells. It has been previously reported that *in vivo* and *in vitro* infections of LSECs by MHV3 were associated with damage and loss of fenestrations (Steffan *et al.*, 1995). Replication of the attenuated 51.6- and YAC-MHV3 viruses was delayed to 96 or 120 h p.i., reflecting their poor tropism for LSECs. In addition, low viral nucleocapsid RNA of attenuated variants was detected by qRT-PCR in infected LSECs at 24 h p.i., suggesting that either viral particles are not internalized or viral transcription is blocked. It was recently reported that LSECs exhibit high-capacity clearance of circulating viruses (Ganesan *et al.*, 2011; Simon-Santamaria *et al.*, 2014), suggesting that LSECs may sequester attenuated MHV3 particles. This hypothesis, however, is not supported by their delayed replication suggesting rather a host cell-dependent control mechanism of viral replication. Indeed, our results indicate that delayed viral replication and low CPE observed in LSECs infected with the attenuated MHV3 variants correlates with higher IFN- $\beta$  production

possibly through activation of TLR3 and/or RIG-1 signaling pathways, suggesting a role for IFN- $\beta$  in the lower tropism of 51.6- or YAC-MHV3 variants for LSECs. Mazaleuskaya *et al.* (2012) have reported that activation of TLR3, but not TLR2, TLR4 or TLR7, induced type I IFN-mediated suppression of MHV3 virus production in macrophages. Wu *et al.*, (2010) have demonstrated that IFN- $\beta$  production by LSECs depended on TLR3 signaling pathway and HCV-infected human LSECs were shown to produce type I or III IFN through TLR7 and RIG-1 activation (Giugliano *et al.*, 2015). The IFN- $\beta$ -dependent control of attenuated MHV3 variant replication, however, was lost after 72 h p.i., as viral replication and CPE became detectable, suggesting either a decrease in IFN- $\beta$  production or occurrence of reversion mutants. Further work will be done to clarify these possibilities.

On the other hand, the low IFN- $\beta$  response in MHV3-infected LSECs, leading to rapid viral replication and CPE, may be favored by evasion of viral RNAs from detection by viral sensors or blockade of their signaling pathways. We have observed that in contrast to attenuated strains, MHV3 induced neither TLR3 nor RIG-1 expression in LSECs, we can thus speculate that MHV3 may be lower detected in infected cells. It was previously demonstrated that MHV replication partially takes place inside a double membrane vesicle (Perlman & Netland, 2009). Such vesicle may possibly protect viral RNAs from detection by cytoplasmic viral sensors. In addition, it was previously demonstrated that viral nucleoprotein N can express antagonistic effect on type 1 IFN production (Perlman & Netland, 2009). This suggests that higher MHV3 nucleocapsid production, consequent to higher replication rate in LSECs, may directly block IFN- $\beta$  production. Further work will be conducted to address whether viral products or evasion strategies are involved in MHV3-induced impairment of IFN- $\beta$  response.

The inability of attenuated MHV3 variants to establish a rapid and productive infection in LSECs, as demonstrated in *in vitro* studies, correlated with induction of a less severe hepatitis. Indeed, 51.6-MHV3 infection resulted in lower viral replication, transaminase levels and liver damages than MHV3 infection. The 51.6-MHV3 variant only differs from the pathogenic MHV3 by its inability to productively infect LSECs but maintained its virulence for hepatocytes, KC and Ito cells (Martin *et al.*, 1994), indicating that the low permissivity of LSECs to such variant protects against fulminant hepatitis. In addition, the attenuated YAC-



MHV3 (Lamontagne & Dupuy, 1984), expressing low ability to replicate in LSECs, also induced light and transient hepatic lesions, strengthening the important role of LSECs in the control of viral hepatitis. We can thus speculate that low permissivity of LSECs to viral replication by these strains may limit transmission of virus progeny to neighbouring hepatocytes, thus delaying hepatitis process.

The *in vivo* infection by the pathogenic MHV3 in comparison to the attenuated strains, however, was accompanied with higher production of IFN- $\beta$  in the liver. The apparent discrepancy between the *in vitro* and *in vivo* results may reflect the combined IFN- $\beta$  responses of several hepatic cells *in vivo* compared to the single response of *in vitro* cultured LSECs to viral infection. Indeed, IFN- $\beta$  can be produced by several cell types, such as KC, macrophages, dendritic cells and hepatocytes upon viral infection (Heim & Thimme, 2014). High IFN- $\beta$  levels in the liver of MHV3-infected mice correlated with increased expression of TLR3, RIG-1 and IRF-7 genes, suggesting a role for these pathways in IFN- $\beta$  production. Transcription of these genes was not induced by MHV3 in *in vitro* infected LSECs supporting the possibility that other hepatic cells are mainly involved in IFN- $\beta$  production *in vivo*. Accordingly, LSECs are not considered as a major source of IFN- $\beta$  (Heim & Thimme, 2014). Nevertheless, higher IFN- $\beta$  production in liver did not protect against MHV3-induced hepatitis. Rather, IFN- $\beta$  levels correlated with viral load and severe hepatic lesions in MHV3-infected mice. It was already observed that a peak of IFN production coincided with high viral replication in peritoneal macrophages from MHV3-infected C57BL/6 mice while less virus and weak IFN response were observed in cells from mice genetically resistant to MHV3 infection (Schindler *et al.*, 1982). Indeed, the lower levels of IFN- $\beta$  in the liver of mice infected with the attenuated MHV3 variants correlated with lower viral load, probably resulting from an early control of viral replication by LSECs that delayed replication in the hepatic parenchyma.

We report here for the first time that productive *in vitro* infection of LSECs by MHV3 reverts their physiological tolerogenic functions in promoting a pro-inflammatory phenotype. Indeed, MHV3 infection induced high levels of IL-6, TNF- $\alpha$  and chemokines while attenuated MHV3

strains rather promoted release of tolerogenic IL-10. Such reversion was reflected *in vivo* by higher increases of inflammatory cytokines and chemokines in the liver of MHV3-infected mice while levels IL-10 and/or TGF- $\beta$  were only found in the liver of mice infected with the attenuated strains. These results are in line with our previous observations of higher intrahepatic levels of anti-inflammatory cytokines in the liver of mice infected with 51.6- and YAC-MHV3 (Jacques *et al.*, 2008) and support that preservation of LSECs tolerogenic functions during acute hepatitis is imperative to control viral-induced detrimental inflammatory responses.

Imbalance in tolerogenic and inflammatory cytokine profiles according to infection by pathogenic or attenuated MHV3 strains may reflect differential TLRs activation by viral fixation and/or replication. In agreement, we observed increased expression of TLR3 in attenuated MHV3 strains-infected LSECs while TLR2 was rather induced in MHV3-infected cells. We have already demonstrated that IL-6 and TNF- $\alpha$  production by MHV3-infected macrophages resulted from TLR2 activation by surface (S) viral protein (Jacques *et al.*, 2009b). The production of TNF- $\alpha$  by LSECs is known to depend on TLR1 to 4, -6 and -8 while IL-6 is produced following activation of TLR1 to 4 only (Wu *et al.*, 2010; Broering *et al.*, 2011). TLR2 sensing of viral capsids from adeno-associated viral vectors at LSEC surface was also shown to upregulate inflammatory cytokines but not type I IFN, in contrast to TLR3 (Hösel *et al.*, 2012). It was also demonstrated that TLR1/2 ligand (PamC3), but not TLR3 ligand (poly I:C) or LPS reverted the suppressive properties of LSECs (Liu *et al.*, 2013). Since TLR2 knockdown in *in vitro* MHV3-infected LSECs resulted in significant decreased expression of IL-6 and CXCL1, TLR2 induction and activation by MHV3 may be one determining factor in MHV3-induced conversion of LSECs to an inflammatory phenotype. In agreement, lower hepatitis severity and inflammatory responses were observed in TLR2 knock-out mice (submitted paper).

The differences in chemokine levels induced by the pathogenic and attenuated MHV3 strains may explain the differences in intrahepatic leukocyte recruitment observed. Indeed, lower levels of the chemokines CXCL1 and CCL2 in livers from 51.6- and YAC-MHV3-infected

mice correlated with delayed or lower intrahepatic recruitment of neutrophils and macrophages (Zeremski *et al.*, 2007) as well as with smaller inflammatory foci without extensive necrosis areas in these mice. On the other hand, despite high induction of chemokines throughout infection with MHV3, neutrophils were only transiently recruited and numbers of NKT, T and B lymphocytes progressively decreased while they were preserved or less affected in mice infected with the attenuated strains. We have previously demonstrated that intrahepatic NKT cells undergo higher apoptosis following infection by MHV3 than YAC-MHV3 (Jacques *et al.*, 2008) and that B and T cells are decreased in lymphoid organs during MHV3 infection, affecting lymphocyte recruitment into the liver (Lamontagne *et al.*, 1989). The lower decrease of intrahepatic B and T lymphocytes in mice infected with the attenuated variants may reflect lower viral-induced cell depletions in lymphoid organs, as previously reported in YAC-MHV3-infected mice (Lamontagne *et al.*, 1989; Lamontagne *et al.*, 2001). We can thus hypothesize that MHV3 infection breaks LSEC-mediated liver tolerance in promoting high liver inflammatory response and chemokine production that favor cell recruitment, but subsequent infection of recruited permissive cells may compromise the efficiency of antiviral innate defense, contributing to dissemination of viral infection to hepatocytes and hepatic damages.

Dysfunctions of LSECs can also lead to disturbed regulation of hepatic microcirculation favoring intravascular coagulation, focal ischemia and liver injury. Sinusoidal blood flow is controlled by several vasoactive factors produced by LSECs such as endothelin-1 (ET-1) and nitric oxide (NO) that act antagonistically to favor constriction and dilatation of hepatic sinusoids respectively (reviewed in Oda *et al.*, 2003). LPS and oxidative stress conditions are known to favor vasoconstriction of hepatic sinusoids that ultimately leads to intrahepatic portal hypertension and liver injury (Kwok *et al.*, 2009). It has been reported that LPS-induced disruption of ET-1/NO balance was mediated through induction of CAV-1, which negatively interacts with the activity of endothelial NO synthase (Kamoun *et al.*, 2006; Kwok *et al.*, 2009). CAV-1 is thus a key signaling molecule involved in stress-induced vascular dysfunctions. We have observed that MHV3 infection of LSECs induced CAV-1 expression and concomitant reduction of NO production while such disorders were absent in attenuated 51.6- and YAC-MHV3-infected LSECs, indicating that vascular functions of LSECs are also

impaired by MHV3 infection. It was already reported that susceptibility of mice to MHV3 infection inversely correlated with levels of NO in the liver, but the mechanism was not clearly elucidated (Tsuhaiko *et al.*, 2006). Moreover, an increased release of the Fgl2 procoagulant factor by LSECs was associated with liver necrosis and MHV3-induced fulminant hepatitis (Marsden *et al.*, 2003). We have shown that Fgl2 expression by LSECs only increased following MHV3 infection. It has been already proposed that the viral nucleocapsid protein is involved in Fgl2 induction, supporting that Fgl2 levels correlate with viral replication (Ning *et al.*, 2003). Liu *et al.* (2015) have also recently reported that TNF- $\alpha$  could promote Fgl2 expression in LSECs.

Thus, the combination of CAV-1/NO imbalance and Fgl2 induction in MHV3-infected LSECs may contribute to aggravate hepatitis through vascular disorders favoring hypertension, hypoxia and liver necrosis. In addition, we can suppose that intravascular resistance, consecutive to NO defect, may be another contributing factor to impair leukocyte trafficking into the liver of MHV3-infected mice. Accordingly, low or no hepatic microcirculation disturbances in attenuated 51.6- and YAC-MHV3-infected mice may favor a greater recruitment of lymphoid cells, as observed, leading to rapid efficient antiviral responses (Lamontagne *et al.*, 2001).

Finally, necrotic cells in liver are known to secrete alarmins such as HMGB-1 and, more recently, the IL-33 (Arshad *et al.*, 2012). In agreement with our previous *in vivo* observations, IL-33 production increased in the liver of MHV3-infected mice in both LSECs and hepatocytes but the mechanism involved was not yet elucidated (Arshad *et al.*, 2013). Herein, our *in vitro* results showed that IL-33 expression only increased in LSECs infected with MHV3, suggesting that productive viral replication and subsequent viral-induced cell damages are essential for IL-33 production. Indeed, IL-33 was shown to be up-regulated in chronic HBV and HCV infections and acute liver failure (Marvie *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2010). In addition, high IL-33 serum level was associated with liver damages in HBV and HCV infections, suggesting that IL-33 could be a predictive indicator of viral hepatitis evolution (Wang *et al.*, 2012a, 2012b).

This work with the MHV3 animal model of viral acute hepatitis highlights viral-induced dysfunctions of LSECs as a major factor of tolerance breakdown and vascular disorders in hepatitis evolution. The use of LSEC-restricted MHV3 variants allowed us to better discriminate the importance of LSECs, over other hepatic cell types, in tolerance/inflammation imbalance during acute viral infection.

### **3.1.6- Acknowledgements**

The authors want to acknowledge Corentine Lux, Pascale Bellaud and Eric Massicotte for their technical assistance.

NB. Les références citées dans cet article ont été incluses dans la section bibliographie de la thèse.

### **3.2- Article 2 : Toll-like receptor (TLR)-2 exacerbates murine viral hepatitis**

Cet Article a été soumis à la revue *Journal of Immunology*

À titre d'auteur principal, j'ai fait une contribution essentielle et déterminante à cet article. J'ai contribué de manière significative à la recherche méthodologique, la mise au point et la réalisation de la majorité des protocoles expérimentaux (70%), l'analyse des résultats et en collaboration avec ma directrice, à la rédaction de l'article. Mélanie Burnette, étudiante à la maîtrise au laboratoire, a participé à environ 20% de l'ensemble des travaux et Aveline Filliol ainsi que les Drs Michel Samson et Claire Piquet Pellorce ont contribué aux analyses histologiques et partiellement aux travaux de cytofluorométrie ainsi qu'à la révision du manuscrit.

À : Bleau, Christian

**Objet** : 15-01554-FL Approved MS Receive

CC: Dr. Lamontagne

Dear Dr. Bleau:

This e-mail is to notify you that you are listed as a co-author on a manuscript, titled "TOLL-LIKE RECEPTOR (TLR)-2 EXACERBATES MURINE ACUTE VIRAL HEPATITIS.," submitted by Dr. Lamontagne for consideration for publication in The Journal of Immunology. The manuscript has been assigned the manuscript identification number 15-01554-FL.

Regards,

Journal Staff

The Journal of Immunology

**TOLL-LIKE RECEPTOR (TLR)-2 EXACERBATES MURINE ACUTE VIRAL  
HEPATITIS**

**Christian Bleau<sup>\*</sup>, Mélanie Burnette<sup>\*</sup>, Aveline Filliol<sup>†</sup>, Claire Piquet-Pellorce<sup>†</sup>, Michel  
Samson<sup>†</sup>, and Lucie Lamontagne<sup>\*</sup>**

*\*Department of Biological Sciences, Université du Québec à Montréal, Montreal Canada,  
H3C 3P8;† U.1085 Inserm, IRSET, Institute of Research in Environmental and Occupational  
Health, Université de Rennes 1, 35043 Rennes, France*

**Corresponding author**

Dre Lucie Lamontagne DMV, Ph.D.  
Département des Sciences Biologiques  
Université du Québec à Montréal  
C.P. 8888 Succ. Centre-Ville  
Montréal, Qué, Canada H3C 3P8

**Running title:** TLR-2 exacerbates murine acute viral hepatitis

**Key words:** viral hepatitis- TLR2- inflammation – cytokines – chemokines- neutrophils-  
macrophages – NK and NK-T cells.



### 3.2.1- Abstract

Viral replication in liver is generally detected by cellular endosomal TLRs and cytosolic helicase sensors that trigger antiviral inflammatory responses. Recent evidences suggest that surface TLR2 may also contribute to viral detection through the recognition of viral coat proteins but its role on viral hepatitis outcome remains unknown. In this study, we examined *in vivo* the role of TLR-2 on acute hepatitis process induced by the highly virulent mouse hepatitis virus (MHV) type 3, exhibiting ability to ligate and activate TLR2. To address this, C57BL/6 (WT) and TLR2 KO groups of mice were intraperitoneally (i.p) infected with MHV3 and compared to infection by the lower virulent MHV-A59 serotype, showing no affinity for TLR2. MHV3 infection provoked a fulminant hepatitis in WT mice as evidenced by early death time and high AST/ALT levels, histopathological lesions and viral replication while hepatitis was less severe in TLR2 KO or WT mice infected with MHV-A59. The severity of MHV3-induced hepatitis correlated with higher hepatic expression of TLR2, IFN- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL1, CCL2, CXCL10 and the alarmin IL-33 in WT compared to TLR2 KO mice. Intrahepatic recruitment of neutrophils or macrophages occurred early but transiently in MHV3-infected WT mice while it was delayed but thereafter sustained in MHV3-infected TLR2 KO and MHV-A59-infected WT mice. Taken together, these results support a new aggravating inflammatory role for TLR2 in the fulminance of acute viral hepatitis concurrently with viral replication effects on liver cells. Blocking of TLR-2 pathway may thus be considered as a new potential therapeutic approach in controlling inflammation-mediated hepatic damages in acute viral-induced hepatitis.

### 3.2.2- Introduction

Acute liver failure (ALF) is a serious viral and drug-induced liver disease but a large proportion of ALF cases are from unknown origin (Bernal *et al.*, 2010). Human hepatitis viral infections may present subclinical to severe acute phase patterns precluding to viral clearance or, in some cases, leading to chronic hepatitis (reviewed in Rehermann & Nascimbeni, 2005). The human hepatitis B (HBV) and C (HCV) viruses infect more than 500 million people worldwide (Lavanchy, 2009; Lee, 1997). About 30% of HCV-infected people eliminate the virus during the acute phase of the infection while the remaining infected people develop a

chronic hepatitis (reviewed in Rehmann & Nascimbeni, 2005). Most HBV-infected people clear the virus spontaneously, but some individuals fail to eliminate the virus in the acute phase (Lee, 1997). Hepatic lesions occurring during viral infections are associated both with inflammatory responses and viral replication (Ramadori *et al.*, 2008), and depend on a poorly characterized balance between innate immune cells-virus interactions and the control of viral replication.

Host immune recognition of viruses during infections relies mainly on endosomal Toll-like receptors (TLR-7/8, 9) and cytosolic helicases (RIG-1 and MDA-5) that sense viral RNA or DNA and trigger signaling pathways leading to inflammatory cytokines, chemokines and antiviral interferon type 1 (IFN  $\alpha/\beta$ ) production. (reviewed in Broering *et al.*, 2011). IFNs act in a paracrine/autocrine manner to upregulate the transcription of numerous genes involved in various antiviral mechanisms. Chemokines and cytokines act indirectly against viral invaders in recruiting and activating various innate and immune cell subsets (reviewed in Brass & Brenndörfer, 2014).

There are increasing evidences that surface TLRs, such as TLR2 or TLR4, may also trigger acute inflammatory response against viral infections through recognition of viral coat proteins (Dolganiuc *et al.*, 2004; Hoffmann *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2010; Villalba *et al.*, 2012). Activation of TLR2-dependent signaling pathways leads to the production of various chemokines involved in the recruitment of NK cells, macrophages, neutrophils and B and T cell subsets. In the innate immune phase of the infection, recruited macrophages and neutrophils express several TLRs, including surface TLR2 (reviewed in Mencin *et al.*, 2009). Recent studies have reported overexpression of TLR-2 in the liver and monocytes from HCV-infected patients correlating with hepatic inflammation and damages, suggesting a role for TLR2 in hepatitis-associated inflammation (Berzsenyi *et al.*, 2011; Riordan *et al.*, 2006; Ronit *et al.*, 2013). Nevertheless, the precise contribution of TLR2 in antiviral defenses and hepatitis outcome, especially in the acute phase of infection, remains unclear and needs investigation.

The mouse hepatitis viruses (MHV), belonging to coronavirus group, induce acute or subclinical hepatitis in mice according to serotypes and are used as models to study viral-

induced inflammatory and immune disorders in the liver. Following intraperitoneal (i.p.) infection, the high hepatotropic MHV3 serotype induces acute lethal hepatitis in C57BL/6 mice within 4 days postinfection (p.i.) (Le Prévost *et al.*, 1975) whereas the low hepatotropic MHV-A59 induces a subclinical hepatitis, presumably related to a rapid type 1 IFN-mediated suppression of viral replication by macrophages (Wijburg *et al.*, 1997; Cervantes-Barragan *et al.* 2009). In contrast, inflammatory mediators such as tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1, transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , leukotriene B4 and mouse fibrinogen-like (Fgl)-2 protein are strongly produced by MHV3-infected macrophages (Pope *et al.* 1995), suggesting that exacerbated inflammatory responses are involved in MHV3-induced fulminant hepatitis. Within 72 h of infection, liver dysfunction in MHV3-infected mice results from several foci of extensive necrosis (Lamontagne *et al.*, 1989b) in contrast with mice infected with MHV-A59 serotype (Lavi *et al.*, 1986).

Hepatocytes represent the main cell target for infection by MHVs although Kupffer cells, liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) and Ito cells are also permissive to MHV3 infection (Martin *et al.*, 1994). All MHV serotypes use the CEACAM1a molecule as viral receptor for infection of host cells through interaction with their viral surface (S) protein (Godfraind et Coutelier, 1998). However, it has been previously demonstrated that the differential levels of hepatitis, viral replication and necrosis induced by MHV serotypes was largely related to the specificity of their viral S protein (Navas *et al.* 2001), suggesting that interaction with molecules other than the viral receptor CEACAM1a may determine their virulence for liver. Accordingly, previous *in vivo* studies revealed higher levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in livers from MHV3-infected C57BL/6 mice compared with TLR2 KO mice, suggesting an inflammatory role for TLR2 in viral infection (Jacques *et al.*, 2009b). We have demonstrated *in vitro* that TLR2 activation by the MHV3-S coat protein triggers proinflammatory responses in macrophages (Jacques *et al.*, 2009b). However, TLR2-dependent inflammatory cytokine production has not been reported in MHV-A59-infected macrophages (Zhou *et al.*, 2010).

Intrahepatic Kupffer cells (KC), NK and NK-T cells are considered as major contributors to antiviral responses and cytokines and chemokines production that leads to intrahepatic

recruitment of leucocytes (Tacke et al., 2009). Recent works suggest that KCs limit the severity of hepatitis by removing apoptotic hepatocytes, avoiding the activation of alarmins, such as HMGB-1 protein or IL-33, and subsequent neutrophil infiltration (Arshad et al., 2013; Sitia et al., 2002, 2011). As all these cells express TLR2 (reviewed in Nakamoto & Kanai, 2014), the delicate balance between protective or pathological effects of inflammatory responses in the liver may be disturbed by viral fixation to TLR2, leading to inflammation-mediated liver injury concurrently with viral-induced cell necrosis.

In this study, we demonstrate that TLR2 aggravates the high hepatotropic MHV3-induced viral hepatitis as evidenced by lower mortality rate, hepatic lesions, viral replication, inflammatory cytokine and chemokine levels and no disturbances in intrahepatic inflammatory cell, NK, NK-T and T cell recruitment in infected TLR2 KO mice in comparison to WT mice. Infection by the lower hepatotropic MHV-A59 induced milder hepatitis and inflammation comparable to MHV3-infected TLR2 KO mice, suggesting that higher virulence of MHV3 serotype may be related to its specific ability to induce TLR2 signaling in the liver.

### **3.2.3- Material and methods**

#### **3.2.3.1- Mice**

Female C57BL/6 (Charles River, St-Constant, Qc, Canada) and TLR2 KO (C57BL/6-129 Tlr<sup>tm/Kir</sup>/J, Jackson Lab., Bar Harbour, MA) mice were housed in a HEPA-filtered air environment. All experiments were conducted with mice between 8 to 10 weeks of age, in compliance with the regulations of the Animal Committee of the University of Quebec in Montreal (CIPA).

### **3.2.3.2- Viruses and cells**

The high hepatotropic MHV3 is a cloned substrain isolated from the liver of MHV3-infected DBA2 mice (Dupuy & Rodrigue, 1981). The low hepatotropic MHV-A59 serotype was obtained from ATCC (Rockville, MD, USA). Both viruses were replicated in L2 cells as previously described (Dupuy & Rodrigue, 1981) and used within 3 passages. Pathogenic properties of MHV3 were assessed routinely in mice and on L2 cultures. The mouse fibroblastic L2 cell line used for virus production and titration was grown in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS and antibiotics.

### **3.2.3.3- *In vivo* viral infections**

Groups of 6-7 wild type C57BL/6 and TLR2 KO mice were infected intraperitoneally (i.p.) with  $10^3$  TCID50 MHV3 or MHV-A59 viruses. Mock-infected mice received a similar volume of PBS. Clinical signs and survival percentages were recorded and mice were sacrificed when limit points were reached as determined by CIPA regulations (lethargy and/or weight loss exceeding 20%). In other experiments, mice were sacrificed by CO<sub>2</sub> anoxia at 24, 48 and 72h post-infection (p.i.) without regard of clinical signs, and liver and blood were collected and processed for further analyses.

### **3.2.3.4- Histopathological, transaminase activity and immunohistochemical analyses**

The histopathological analysis of liver was done by hematoxylin-eosin staining. Levels of serum ALT and AST transaminases were assessed according to the IFCC primary reference procedures using Olympus AU2700 Autoanalyser<sup>®</sup> (Olympus Optical, Tokyo, Japan). Immunolocalization of IL-33 or CXCL10 was performed by histochemistry staining using primary goat anti-mouse-IL-33 and anti-CXCL10 (R&D System, Minneapolis, MN) and secondary HRP-conjugated rabbit anti-goat antibody for IL-33 (Dako, Markham, On) and OmniMap anti-Rabbit-HRP (RUO) for CXCL-1 followed by hematoxylin counterstaining in Ventana machine (Ventana Medical Systems, Inc. Tucson, AZ), as previously described (Arshad *et al.*, 2013).

### 3.2.3.5- RNA isolation and RT-qPCR

Total RNA from frozen liver samples of C57BL/6 and TLR2 KO mice was extracted using TRIzol reagent (In Vitrogen, Burlington, Ont., Canada) and residual genomic DNA was removed with the Turbo DNA-free kit (Ambion, Austin, TX). One  $\mu$ g of RNA was retro-transcribed into cDNA using the High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Real time PCR amplification was carried out on 25ng cDNA using the HotStart-IT™ SYBR® Green qPCR Master Mix (USB Corporation, Cleveland, OH) on a ABI 7300 system (Applied Biosystems). Threshold cycle values (Ct) were collected and used for “ $\Delta\Delta$ Ct” analysis. Specific primers for HPRT, MHV-nucleocapsid, TLR-2, TLR-3, -4, -7, MDA-5, RIG-1, IFN- $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-33, fibrinogen-like factor 2 (Fgl-2), CXCL1, CXCL10, and CCL2 were used (Table I). The relative gene expression was normalized to HPRT as endogenous control and expressed as a ratio to gene expression in mock-infected mice livers (arbitrarily taken as 1). The specificity of the PCR products was confirmed by melting curve analyses.

**Table II : Primer sets used for quantitative reverse transcription-PCR**

Gene	Forward primer	Reverse primer
HPRT	5'-GAAAGACTTGCTCGAGATGTCATG-3'	5'-CACACAGAGGGCCACAATGT-3'
IFN- $\beta$	5'-CGGACTTCAAGATCCCTATGGA-3'	5'-TGGCAAAGGCAGTGTAACTCTTC-3'
IL-6	5'-TCGGAGGCTTAATTACACATGTTC-3'	5'-TGCCATGCACAACCTCTTTTCT-3'
TNF- $\alpha$	5'-TCCCAGGTTCTCTTCAAGGGA-3'	5'-GGTGAGGAGCACGTAGTCGG-3'
CCL2	5'-GCAGCAGGTGTCCCAAAGAA-3'	5'-GGTCAGCACAGACCTCTCTCTTG-3'
CXCL10	5'-GGCCATAGGGAAGCTTGAAAT-3'	5'-TCGTGGCAATGATCTCAACAC-3'
TLR2	5'-CCCTGTGCCACCATTTC-3'	5'-CCACGCCACATCATTCTC-3'
TLR3	5'-TGGGCTGAAGTGGACAAATCT-3'	5'-TGCCGACATCATGGAGGTT-3'
TLR4	AGCTTCAATGGTGCCATCATT	CCAGGTGCTGCAGCTCTTCT

TLR7	5'-CAGTGA ACTCTGGCCGTTGA-3'	5'-CAAGCCGGTTGTTGGAGAA-3'
MHV-N	5'-TGGAAGGTCTGCACCTGCTA-3'	5'-TTTGGCCCACGGGATTG-3'
RIG-I	5'-GCCAGAGTGT CAGAATCTCAGTCAG-3'	5'-GAGAACACAGTTGCCTGCTGCTCA-3'
MDA-5	5'-GCCCTCTCCTTCCTCTGAGACT-3'	5'-GCTGGAGGAGGGTCAGCAA-3'
IL-33	5'-GCTGCGTCTGTTGACACATTG-3'	5'-GGGAGGCAGGAGACTGTGTTAA-3'
Fgl2	5'-CGTTGTGGTCAACAGTTTGA-3'	5'-GATGTTGAACCGGCTGTGACT-3'
CXCL1	5'-CCGAAGTCATAGCCACACTCAA-3'	5'-CAAGGGAGCTTCAGGGTCAA-3'

---

### 3.2.3.6- ELISA assays

Frozen liver samples from C57BL/6 and TLR2 KO mice were weighted and homogenized in NP40 lysis buffer (In Vitrogen) completed with a protease inhibitor cocktail and 1 mM PMSF (Sigma Aldrich, St-Louis, MA) for protein extraction. Liver suspension was kept on ice for 30 min. and centrifuged 10 min. at 13000 RPM. Determination of IFN- $\beta$  (PBL, Piscataway, NJ), IL-6, TNF- $\alpha$  (BD Biosciences, Mississauga, Ont., Canada), and CXCL1, CXCL10, CCL2 (eBiosciences, San Diego, CA) levels in liver lysates was carried out according to the manufacturer's procedure.

### 3.2.3.7- Virus titration

Frozen liver samples from 24 and 72h MHV3- or MHV-A59-infected C57BL/6 and MHV3-infected-TLR2 KO mice were weighted and homogenized in cold PBS. Suspension was then centrifuged at 13000 RPM for 30 min, 10-fold serial-diluted and tested for viral detection on L2 cells cultured in 96-well plates. Cytopathic effects, characterized by syncytia and cell lysis, were recorded at 72h p.i. and virus titers were determined according to Reed-Muench method and expressed as  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>.

### 3.2.3.8- Cytofluorometric studies

Livers were perfused with PBS through the portal vein to remove blood cell contamination prior to dissection. After homogenization of liver tissue and elimination of hepatocytes by sedimentation, immune cells were purified using 35% Percoll gradient (Sigma Aldrich, St-Louis, MA) and red blood cells were lysed with a Tris-buffered *ammonium* chloride solution. A million ( $10^6$ ) of leucocytes were incubated with anti-CD16/32 antibodies (BD Biosciences) to block non-specific binding. Cells were then incubated with optimal dilutions of anti-CD3-V500, anti-Gr1-V450, anti-CD11b-PE-Cy7, anti-CD19-APC, anti-CD4-FITC, anti-NK1.1-PerCP-Cy-5.5 and anti-CD8-APC-Cy7 antibodies (BD Biosciences) and fixed in PBS containing 2% FCS, 0.01 M sodium azide and 2% formaldehyde. Stained cells were analyzed on a FACS Aria II ® flow cytometer using BD FACS Diva software (BD Bioscience) and the data were processed using CXP software (Beckman Coulter, Mississauga, Ont, Canada). Dead cells and doublet cells were excluded on the basis of forward and side scatter and analyses were performed on 10,000 events recorded. Myeloid cells, gated by high side scatter, were assessed for CD11b and Gr1 to enumerate macrophages ( $CD11b+Gr1^{inter}$ ) and neutrophils ( $CD11b^+Gr1^{high}$ ). Lymphoid cells were gated according to FSC/SCC and first assessed for NK1.1 and CD3 expression to discriminate NK from NKT cells.  $CD3+NK1.1^-$  T cells were further gated to allow determination of  $CD4^+$  and  $CD8^+$  subpopulations. B lymphocytes were determined by  $CD19^+ CD3^-$  expression.

### 3.2.3.9- Statistical analyses

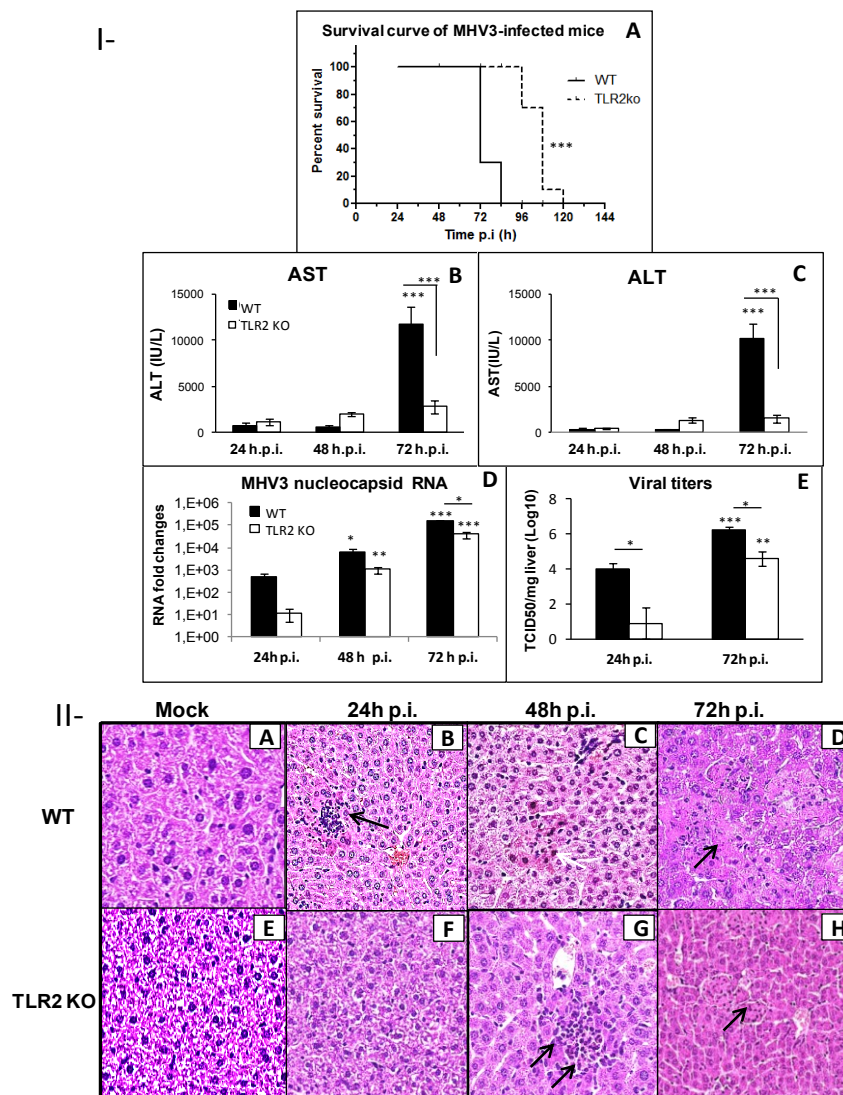
Data were expressed as means  $\pm$  the standard error of the mean. Multiple group analyses for PCR, ELISA and viral titers data were evaluated by one-way ANOVA test with *posthoc* Tukey test using PASW Statistics software (PASW version 18, IBM SPSS Inc. Chicago, IL). Survival curve comparisons were performed using the Log Rank test. Values of  $p \leq 0.05$  were considered as significant.



### 3.2.4- Results

#### 3.2.4.1- TLR2 exacerbates liver damages and increases viral replication in high hepatotropic MHV3-infected mice

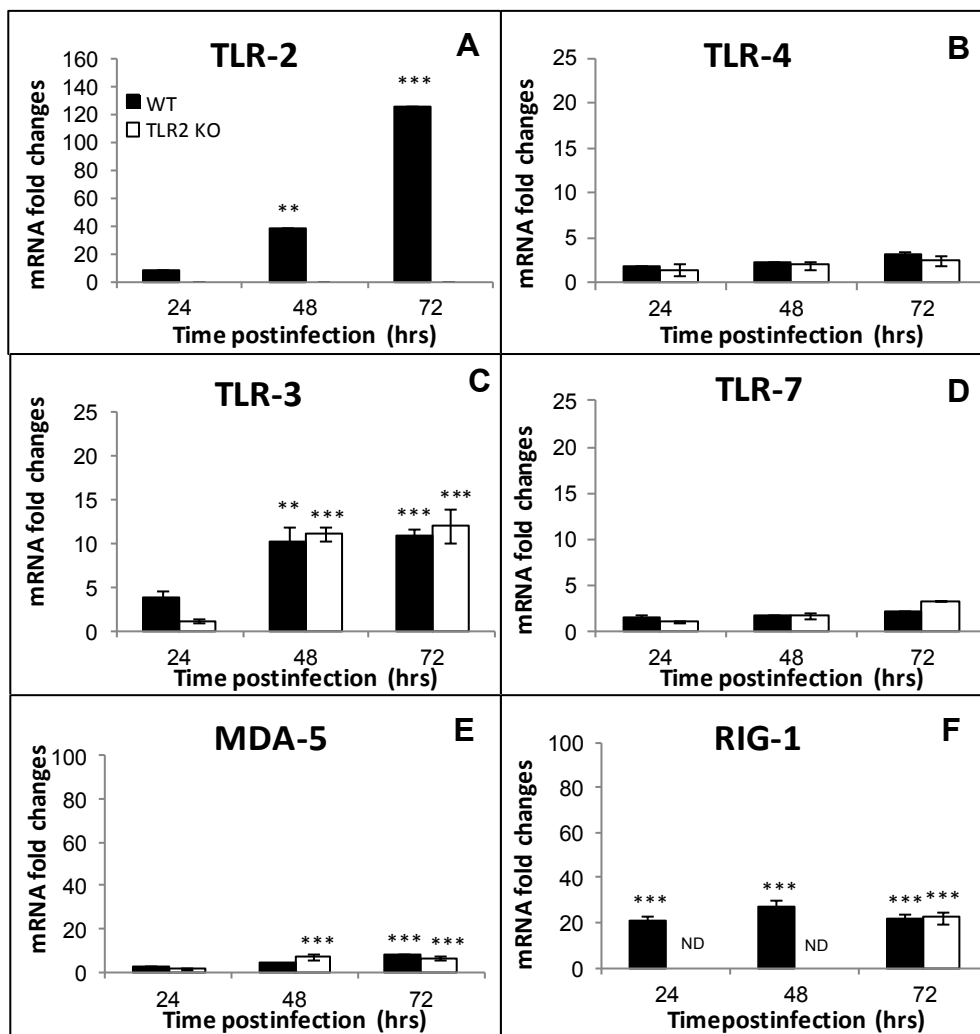
We previously reported milder MHV3-induced acute hepatitis was less severe in TLR2 KO mice (Jacques *et al.*, 2009b). To verify whether TLR2 is involved in the severity of hepatic damages and viral replication during acute MHV3 infection, groups of wild type (WT) and TLR2 knock-out (KO) C57BL/6 mice were i.p. infected and survival rates, liver injuries and viral load in the liver were evaluated from 24 to 72 h postinfection (p.i.). As shown in figure 14 section I-A, the mortality rate of MHV3-infected TLR2 KO mice was delayed and occurred only from 96 to 120 h p.i. ( $p \leq 0.001$ ), in contrast to WT mice, for which mortality started 72 h p.i., attaining more than 70% of the mice. Lower serum AST and ALT transaminase levels were detected after 72 h p.i. in MHV3-infected TLR2 KO when compared with WT mice (Fig. 14- sect. I- B and C) ( $p \leq 0.001$ ). Viral replication, as determined by the expression of the viral nucleoprotein RNA (RT-qPCR) and viral titers, was also lower and delayed in infected TLR2 KO mice compared to WT mice (Fig.14- sect. I-D and E) ( $p \leq 0.05$  to 0.001). Histopathological analysis of the liver revealed low numbers inflammatory cells surrounding necrotic foci in the liver of MHV3-infected WT mice as soon as 24h p.i. (Fig.14- sect. II- B) but inflammatory cells, however decreased at 48h p.i. whereas necrotic foci extended until 72h p.i. (Fig.14 sect. II-C and D). Inflammatory foci were delayed and only detected after 48h p.i. in infected TLR2 KO mice for which less necrotic foci were observed at 72h p.i. (Fig. 14 sect. II-G and H). Taken together, these results suggest that TLR2 deficient mice exhibit milder hepatic damages and delayed and/or lower MHV3 replication.



**Figure 18. Mortality, hepatic damages and viral replication during MHV3-induced hepatitis in C57BL/6 (WT) and TLR2 KO mice.** I. A) Groups of 6 or 7 C57BL/6 (WT) and TLR-2 KO mice were intraperitoneally (i.p.) infected with 1000 TCID<sub>50</sub> (tissue culture infective dose 50%) of MHV3 particles. The percentages of surviving mice were recorded at various times post-infection (p.i.). B-C) Serum samples from MHV3-infected WT and TLR-2 KO were assayed for AST and ALT activity from 24 to 72 h p.i. D-E) MHV3 replication in livers of infected WT and TLR2 KO mice was determined by analysis of the nucleoprotein (MHV-N) RNA expression at 24 to 72 h p.i. by RT-qPCR, and values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice after normalization with HPRT expression. Viral titration (TCID<sub>50</sub>) in liver was done at 24 and 72 h p.i. II. Histopathological analysis was conducted on livers from mock- and MHV3-infected WT and TLR2 KO at 24, 48 and 72 h p.i. Results are representative of two different experiments. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ )

#### **3.2.4.2- Expression of TLR2 is higher induced than expression of other TLRs or helicases in the liver of MHV3-infected mice**

Several endosomal TLRs and helicases can be simultaneously activated and up-regulated by viral infection, triggering inflammatory responses. We explored the hypothesis that MHV3 infection may induce higher expression of surface TLR2 than other TLRs or helicase in the liver. Thus, the kinetics of surface TLR-2 and -4, endosomal TLR-3 and -7, and helicase RIG-1 and MDA-5 gene expression were assessed by qRT-PCR in the liver of MHV3-infected WT and TLR2 KO mice from 24 to 72 h p.i.. As shown in figure 15A, TLR2 gene transcription steadily increased over the course of infection reaching up to 120-fold the expression in mock-infected mice at 72h p.i. ( $p \leq 0.01$  to 0.001). As expected, absence of TLR2 gene expression was confirmed in both mock- and MHV3-infected TLR2 KO mice. Expression levels of endosomal TLR3 or RIG-1 and MDA-5 increased but remained lower than TLR2 gene in both groups of infected mice ( $p \leq 0.01$  to 0.001) (Figs 15C, E and F) whereas the levels of TLR4, TLR7 did not change during MHV3 infection (Figs 15B and D). These data support that MHV3 infection specially increases expression of TLR2 in the liver of infected mice milder affecting affecting other TLRs and helicases.

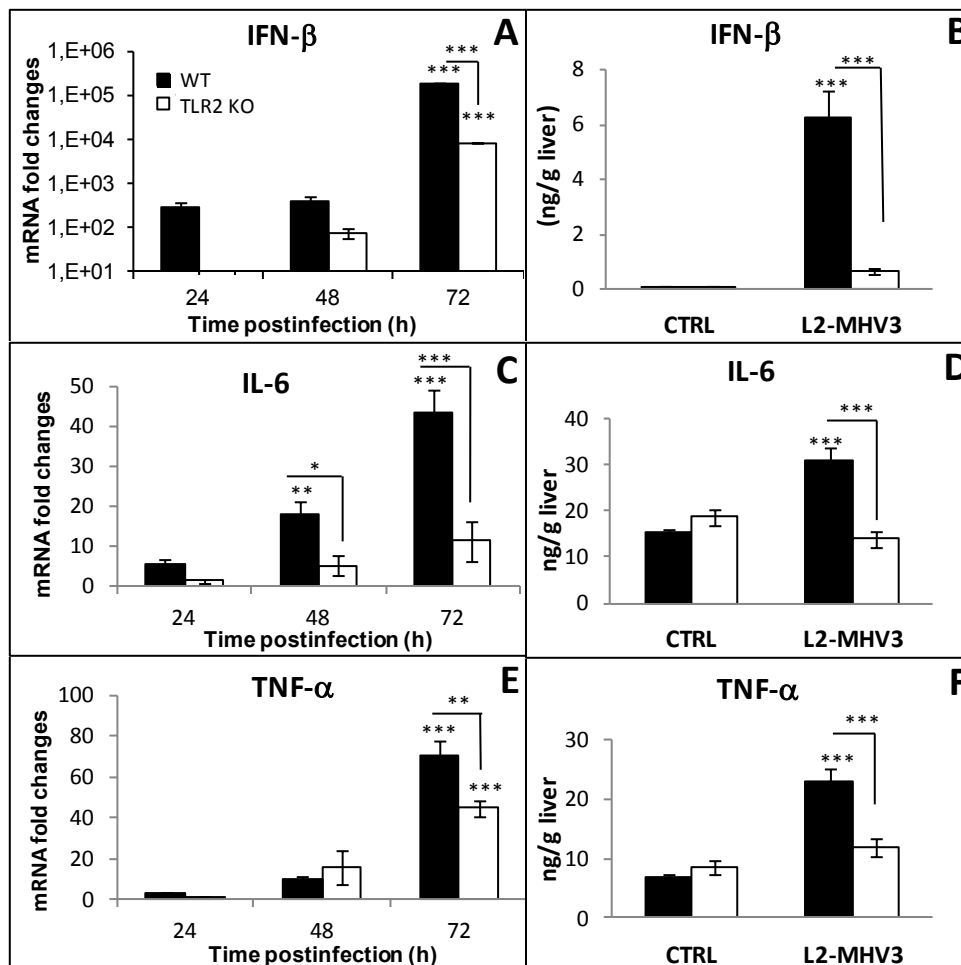


**Figure 19.** Transcription levels of TLR-2, TLR-4, TLR-3, TLR-7 and helicases MDA-5 and RIG-1 genes in the liver of MHV3-infected WT and TLR2 KO mice. Groups of 6 or 7 C57BL/6 (WT) and TLR2 KO mice were i.p. infected with 1000 TCID<sub>50</sub> of MHV3. At 24, 48 or 72 h p.i., livers from each group were collected and Toll-like receptors (TLR-2,-3,-4,-7) (A-D) and helicases (MDA5 and RIG-1) (E and F) mRNA fold changes were analyzed by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice (arbitrary value of 1) after normalization with HPRT expression. Results are representative of two different experiments. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  when compared with respective mock-infected mice or TLR2 KO compared to WT mice. N.D.: not done

### 3.2.4.3- TLR2 favors IFN- $\beta$ and inflammatory cytokines and chemokines production in the liver of MHV3-infected mice

Dietrich *et al.* (2010) have previously reported that TLR2 signaling may lead to IFN- $\alpha/\beta$  production and we have reported that the MHV3 glycoprotein S increases *in vitro* TLR2-dependent IL-6 and TNF- $\alpha$  secretion by peritoneal macrophages (Jacques *et al.*, 2009b). In order to verify whether TLR2 can also be involved in IFN and inflammatory cytokine responses *in vivo*, the levels of IFN- $\alpha/\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 gene expression were evaluated by qRT-PCR and ELISA. As shown in figures 16A and B, transcription and production of IFN- $\beta$  increased at 72h p.i in both MHV3-infected WT and TLR2 KO mice ( $p \leq 0.001$ ), but levels were higher in WT mice ( $p \leq 0.001$ ). No increase in IFN- $\alpha$  transcription was observed in MHV3-infected mice despite increased IRF-7 mRNA levels (results not shown).

As shown in figure 16C, IL-6 gene expression increased throughout the infection in MHV3-infected WT mice ( $p \leq 0.01$  and  $0.001$ ) and this effect was strongly impaired in infected TLR2 KO mice, which developed four-fold lower levels at 72h p.i. ( $p \leq 0.001$ ). IL-6 secretion increased only in the liver of MHV3-infected WT mice ( $p \leq 0.001$ ) (Fig. 16D). Lower expression of TNF- $\alpha$  was also found in the liver of MHV3-infected TLR2 KO than WT mice ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 16E). Such defect in TNF- $\alpha$  mRNA expression correlated with lower secretion of this cytokine 72h p.i. ( $p \leq 0.001$  when compared to mock-infected (CTRL) mice; and  $p \leq 0.01$  or  $0.001$  when comparing TLR2 KO to WT MHV3-infected mice) (Fig 16F).

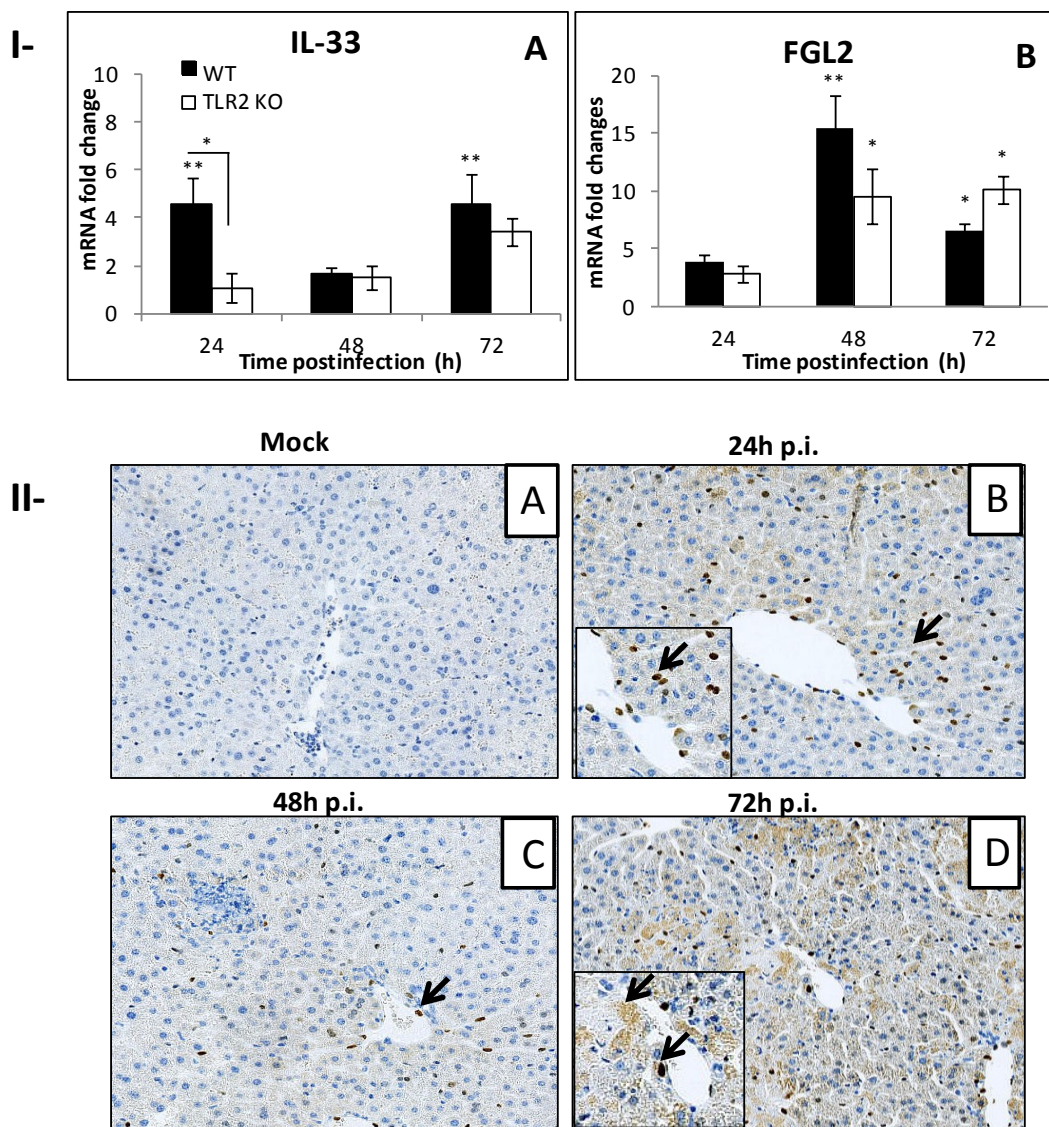


**Figure 20.** mRNA levels and production of IFN- $\beta$  and inflammatory cytokines in the liver of MHV3-infected WT and TLR2 KO mice. Groups of 6 or 7 C57BL/6 (WT) and TLR2 KO mice were i.p. infected with 1000 TCID<sub>50</sub> of MHV3. At 24, 48 or 72 h p.i., livers from each group were collected. mRNA fold increases for IFN- $\beta$  (A) IL-6 (C) and TNF- $\alpha$  (E) were evaluated by qRT-PCR in livers of MHV3-infected WT and TLR2 KO mice. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice (arbitrary value of 1) after normalization with HPRT expression. Production levels of IFN- $\beta$  (B) IL-6 (D) and TNF- $\alpha$  (F) were quantified by ELISA test at 72 h p.i. in livers. Results are representative of two different experiments. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  when compared with respective mock-infected mice or TLR2 KO compared to WT mice (underlined)).

#### **3.2.4.4- TLR2 favors alarmin IL-33 but not fgl2 gene expression in the liver of MHV3-infected mice**

We previously reported that expression of the alarmin IL-33 is up-regulated in the liver of MHV3-infected C57BL/6 mice correlating with an increase of inflammatory cytokines (Arshad *et al.*, 2013). To verify the role of TLR2 in IL-33 induction, mRNA expression levels and immunolabelling for IL-33 were assayed in the liver of WT and TLR2 KO mice infected with MHV3. As shown in figure 17 section I-A , IL-33 gene expression increased only in the liver of infected WT mice at 24 and 72 h p.i. ( $p \leq 0.01$ ). Immunolocalization assay revealed that IL-33 expression was mainly induced in endothelial cells and to lesser extent in hepatocytes at 24 and 72 h p.i. and that this induction was lower 48 h p.i. in MHV3-infected WT mice (Fig.17 sect.II).

It was previously demonstrated that fulminance of MHV3-induced hepatitis correlates with Fgl-2 levels in liver sinusoidal endothelial cells (Ding *et al.*, 1997; Marsden *et al.*, 2003). However, as shown in figure 17, sect. I-B, Fgl2 mRNA levels increased in a comparable manner up to 72h p.i. in the liver of WT and TLR2 KO MHV3-infected mice ( $p \leq 0.05$  to 0.01)

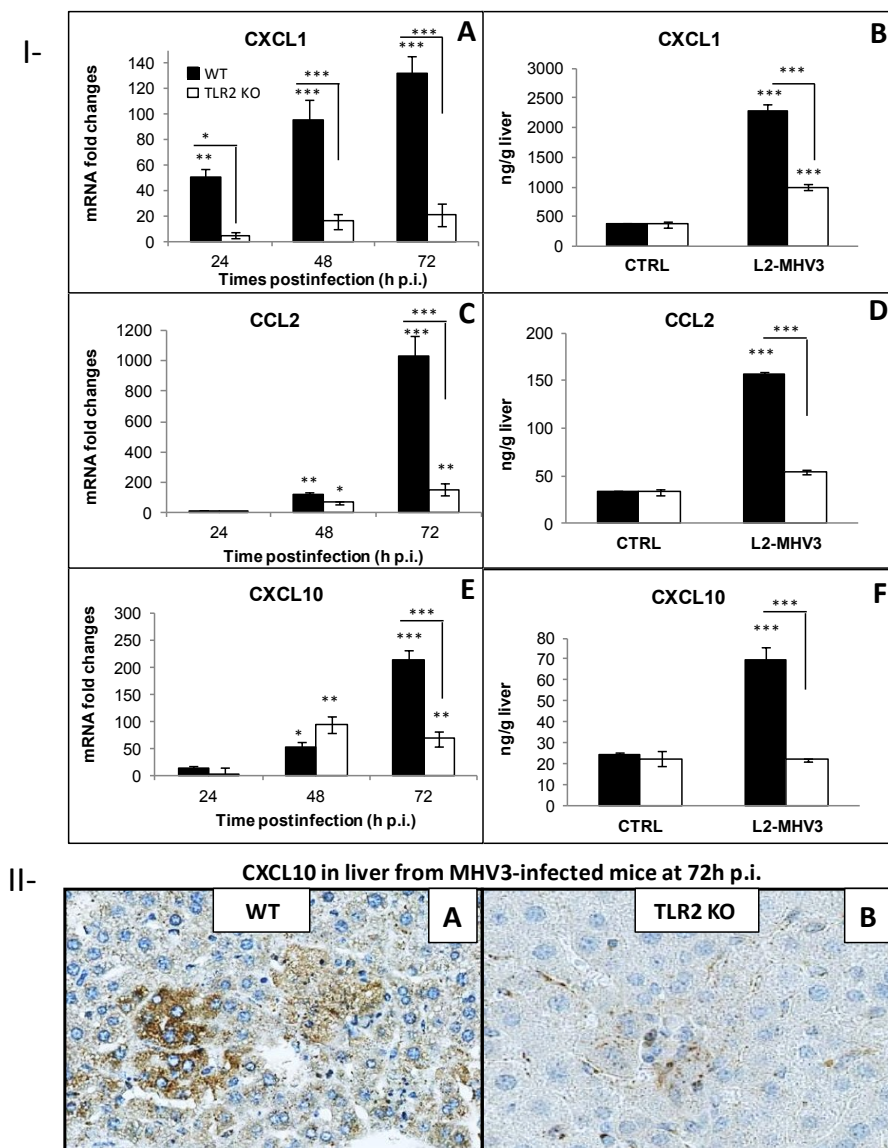


**Figure 21. mRNA level and production of IL-33 or fibrinogen-like 2 (Fgl2) gene in the liver of MHV3-infected WT and TLR2 KO mice.** Groups of 6 or 7 C57BL/6 (WT) and TLR2 KO mice were i.p. infected with 1000 TCID<sub>50</sub> of MHV3. At 24, 48 or 72 h p.i., livers from each group were collected. I- mRNA expression for IL-33 (A) and Fgl2 (B) genes was evaluated by qRT-PCR in livers of MHV3-infected WT and TLR2 KO mice. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice (arbitrary value of 1) after normalization with HPRT expression. II- Expression of IL-33 determined by immunohistochemistry in livers of mock-infected (A) and MHV3-infected WT mice at 24, 48 and 72 h p.i.(B to D). Representative of 6 mice by groups. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  when compared with respective mock-infected mice or TLR2 KO compared to WT mice (underlined)).



#### **3.2.4.5- TLR2 favors CXCL1, CCL2 and CXCL10 production in the liver of MHV3-infected mice**

Activation of TLR2, 4, and 9 is involved in chemokine production during acute and chronic liver diseases (Moles *et al.*, 2014). We thus hypothesized that TLR2 signaling increases chemokines production in the liver during MHV3 infection. As shown in figure 18, section I- A and I-B, mRNA and protein levels of CXCL1 rapidly increased in the liver of MHV3-infected WT mice in contrast to infected TLR2 KO mice ( $p \leq 0.01$  to  $0.001$  when compared to respective mock-infected mice;  $p \leq 0.05$  and  $0.001$  when comparing TLR2 KO to WT MHV3-infected mice). CCL2 and CXCL10 transcription and production levels also increased over infection time in infected WT mice, and these effects were dramatically lower and delayed in infected TLR2 KO mice ( $p \leq 0.05$  to  $0.001$  when compared to respective mock-infected mice;  $p \leq 0.001$  when comparing TLR2 KO to WT MHV3-infected mice) (Fig. 18 sect. I- C to F). Immunolabelling of CXCL10 showed higher expression levels in hepatocytes of MHV3-infected WT when compared with TLR2 KO mice at 72h p.i. (Fig. 18, sect. II- A and B).



**Figure 22.** Expression levels of CCL2, CXCL1 and CXCL10 in the liver of MHV3-infected WT and TLR2 KO mice. Groups of 6 or 7 C57BL/6 (WT) and TLR2 KO mice were i.p. infected with 1000 TCID<sub>50</sub> of MHV3. At 24, 48 or 72 h p.i., livers from each group were collected. I. mRNA expression for CXCL1 (A), CCL2 (C) and CXCL10 (E) genes was evaluated by qRT-PCR in livers from MHV3-infected WT and TLR2 KO mice. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice (arbitrary value of 1) after normalization with HPRT expression. Protein levels of CXCL1 (D), CCL2 (E) and CXCL10 (F) in the liver were quantified by ELISA test at 72 h p.i. II. Expression of CXCL10, determined by immunohistochemistry, in livers of MHV3-infected WT (A) and MHV3-infected TLR2 KO (B) mice. Representative of 6 mice by groups. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  when compared with respective mock-infected mice or TLR2KO compared to WT mice (underlined)).

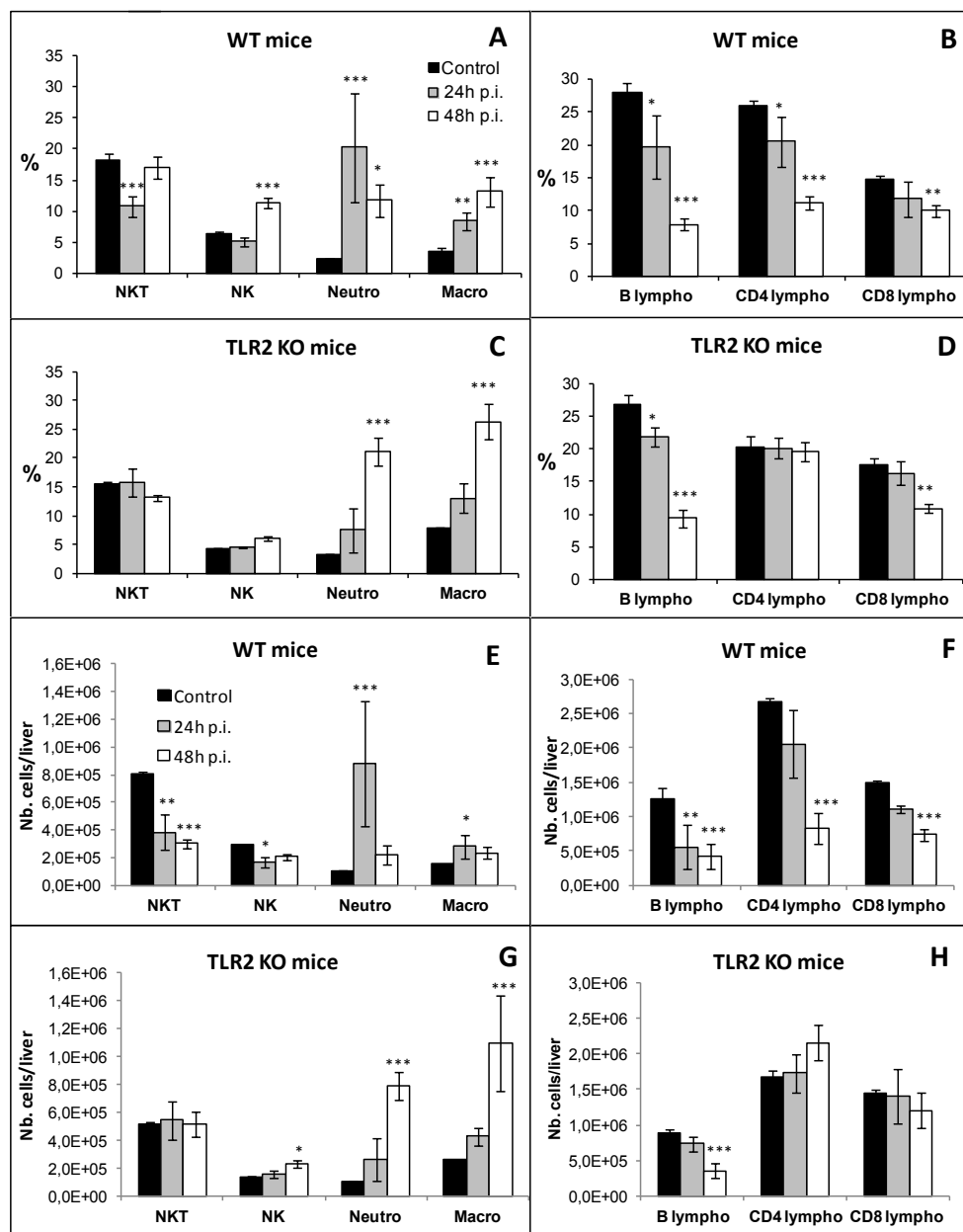
### 3.2.4.6- TLR2 favors rapid but transient recruitment of neutrophils and macrophages in the liver of MHV3-infected mice

To verify whether the increased levels of CXCL1, CCL2 and/or CXCL10 chemokines in the liver of MHV3-infected WT mice correlate with higher inflammatory cell recruitment, intrahepatic mononuclear cells were isolated from the liver of MHV3-infected WT and TLR2KO mice at 24 and 48h p.i., immunolabelled and phenotyped by cytofluorometric analysis. The percentages and numbers of NK-T (NK1.1+CD3+) and NK (NK1.1+CD3-) cells, neutrophils (CD11b<sup>hi</sup>Gr1<sup>hi</sup>), and macrophages (CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>int</sup>) were then compared between groups of mice. Percentages are currently used to present the variations between cell subsets. As shown in figure 19A, percentages of neutrophils (CD11b<sup>hi</sup>Gr1<sup>hi</sup>) and macrophages (CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>int</sup>) rapidly increased at 24h p.i. in MHV3-infected WT mice ( $p \leq 0.05$  to 0.001). Transient decrease in the percentage of NK-T cells was observed at 24h p.i. only ( $p \leq 0.001$ ) and NK cells increased only at 48h p.i ( $p \leq 0.001$ ). In contrast, the effect on neutrophils and macrophages populations were delayed ( $p \leq 0.001$ ) in the liver of MHV3-infected TLR2 KO mice and no changes in NK and NK-T cells were observed (Fig. 19C). As previously reported (Lamontagne *et al.*, 2001), percentages of CD4, CD8 and B lymphocytes decreased in the liver of MHV3-infected WT mice at 24 and 48 h p.i. ( $p \leq 0.05$  to 0.001)(Fig. 19B). Only B and CD8 cell percentages, however, decreased in the liver of MHV3-infected TLR2 KO mice ( $p \leq 0.05$  and 0.001) (Fig.19D).

Analyses of cell subset percentages, however, are not fully representative of inflammatory cell levels when total number of isolated mononuclear cells decreased with time in the liver of MHV3-infected mice, as previously reported (Lamontagne *et al.*, 2001). To properly reflect the evolution of cell subsets in infected mice, absolute numbers of each inflammatory cell subset have been calculated in using the percentage of each cell subset reported to total number of cells. As shown in figure 19E, the rapid but transient increase of neutrophil percentage in the liver of MHV3-infected WT mice was in accordance with the increase in neutrophil numbers at 24 h p.i. only ( $p \leq 0.001$ ). However, increase in absolute number of macrophages was not as higher ( $p \leq 0.05$ ) as increase in percentage. In addition, NK-T and NK cell numbers decreased ( $p \leq 0.05$  to 0.001) in contrast to that seen in percentages while the

decreases of CD4, CD8 and B cells were magnified ( $p \leq 0.01$  to  $0.001$ ) (Fig. 19F). Absolute numbers of each cell subsets in the liver of MHV3-infected TLR2 KO mice were in agreement with their respective percentages since neutrophils and macrophages gradually increased up to 48 h p.i. ( $p \leq 0.001$ ) (Fig. 19G). Numbers of B cells, but not T cell subsets decreased at 48 h p.i. only ( $p \leq 0.001$ ) (Fig. 19H). The extensive cell necrosis in the liver of MHV3-infected WT mice at 72 h p.i. did not allow us to isolate sufficient number of cells for accurate immunolabellings and cytofluorometric analysis.

Taken together, the severe hepatitis and inflammatory response as well as the transient or lower increase in inflammatory cells and decrease of NK, NKT and T cells in the liver of MHV3-infected WT but not TLR2 KO mice, support an aggravating role for TLR2 in acute hepatitis.

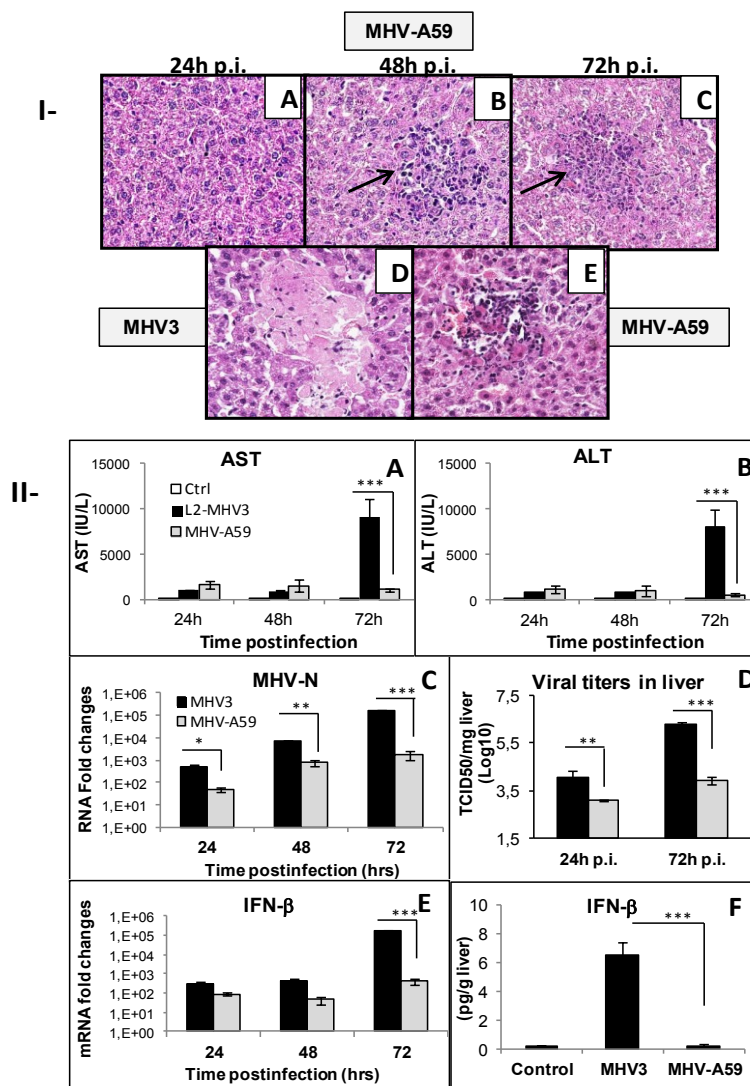


**Figure 23. Analysis of intrahepatic mononuclear cells in livers of MHV3-infected WT and TLR2 KO mice.** Intrahepatic mononuclear cells were isolated from groups of 6 mock-infected or MHV3-infected C57BL/6 and TLR2 KO mice at 24 and 48 h p.i., immunolabelled with NK1.1, CD3, Gr1, CD11b, CD19, CD4 and CD8 monoclonal antibodies and analyzed by cytofluorometry. A-D) Percentages of NK-T (NK1.1+CD3+), NK (NK1.1+CD3-), neutrophils (Gr1<sup>hi</sup> CD11b<sup>hi</sup>) and macrophages (Gr1<sup>+</sup> CD11b<sup>int</sup>) cells were evaluated in livers from mock- and MHV3-infected WT (A) and TLR2 KO (C) mice. Percentages of B (CD19+), and CD4 (CD3+CD4+) and CD8 (CD3+CD8+) subpopulations of CD3+ NK1.1- cells were similarly analyzed (B and D). E-H) Absolute numbers for each cell subset were calculated in using respective percentages reported to total number of isolated mononuclear cells in livers of mock- and MHV3-infected WT and TLR2 KO mice (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

### **3.2.4.7- Lower hepatic damages and viral replication occur in the liver of TLR2-independent MHV-A59-infected mice**

The closely-related MHV-A59 strain differs from MHV3 by its lower hepatotropism and absence of fixation to TLR2 (Zhou *et al.*, 2010). In order to investigate the contribution of TLR2 in the severity of acute hepatitis induced by MHV3 infection, comparable study was conducted in MHV-A59-infected C57BL/6 (WT) mice. As expected, infected WT and TLR2 KO mice did not succumb to infection. Histopathological analysis of the liver of MHV-A59-infected mice from 24 to 72 h p.i. revealed occurrence of inflammatory foci with higher number of inflammatory cells (Fig. 20, sect. I- A to C) in contrast to MHV3-infected WT mice (Fig. 14- sect. II- A to D). Extensive necrosis areas were not observed in the liver of MHV-A59-infected mice in comparison to MHV3-infected mice (Fig.20, sect. I- D and E) and milder hepatic lesions in MHV-A59-infected mice correlated with lower increases in AST and ALT transaminase levels (Fig. 20- sect. II-A and B) ( $p \leq 0.001$ ).

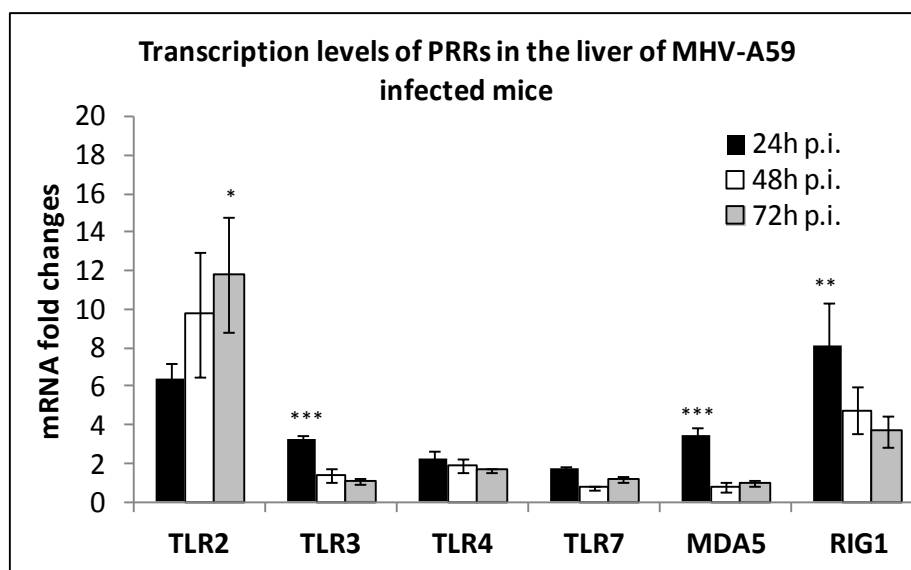
Viral replication, as evidenced by nucleocapsid RNA levels and viral titers, was also reduced in the liver of MHV-A59-infected mice when compared to MHV3-infected mice ( $p \leq 0.05$  to  $0.001$ ) (Fig. 20 sect. II- C and D) and was not concurrent with higher IFN- $\beta$  response, since its mRNA and protein levels were lower in the liver of MHV-A59-infected mice ( $p \leq 0.001$  when comparing MHV-A59- to MHV3-infected mice) (Fig. 20 sect. II- E and F).



**Figure 24. Hepatic damages, viral replication and IFN- $\beta$  production in the liver of C57BL/6 mice infected with the lower hepatotropic and TLR2-independent MHV-A59 strain.** Groups of 6 to 7 C57BL/6 mice were i.p. infected with 1000 TCID<sub>50</sub> of MHV-A59 or MHV3. I- Histopathological analysis was conducted on livers from MHV-A59-infected mice at 24, 48 and 72 h p.i. (A to C). Extensive necrotic foci in MHV3-infected mice (D) compared with lower necrotic foci surrounded by inflammatory cells in liver from MHV-A59-infected mice (E). II- Serum samples from MHV3- and MHV-A59-infected mice were assayed for AST (A) and ALT (B) activity at 24 to 72 h p.i. C-D) Replication of MHV-A59 and MHV3 in livers of infected mice was determined by analysis of the nucleoprotein (MHV-N) RNA expression at 24, 48 and 72 h p.i. by RT-qPCR, and by viral titration (TCID<sub>50</sub>) at 24 and 72 h p.i.. E) mRNA fold increases for IFN- $\beta$  were analyzed in livers from MHV3- and MHV-A59-infected mice by qRT-PCR at 24, 48 and 72 h p.i. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice (arbitrary value of 1) after normalization with HPRT expression. F) Protein levels of IFN- $\beta$  in the liver were quantified by ELISA test at 72 h p.i. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  when MHV-A59 is compared to MHV3).

### 3.2.4.8- Lower expressions of TLR2 and other PRRs, cytokines and chemokines are induced in the liver of TLR2-independent MHV-A59-infected mice

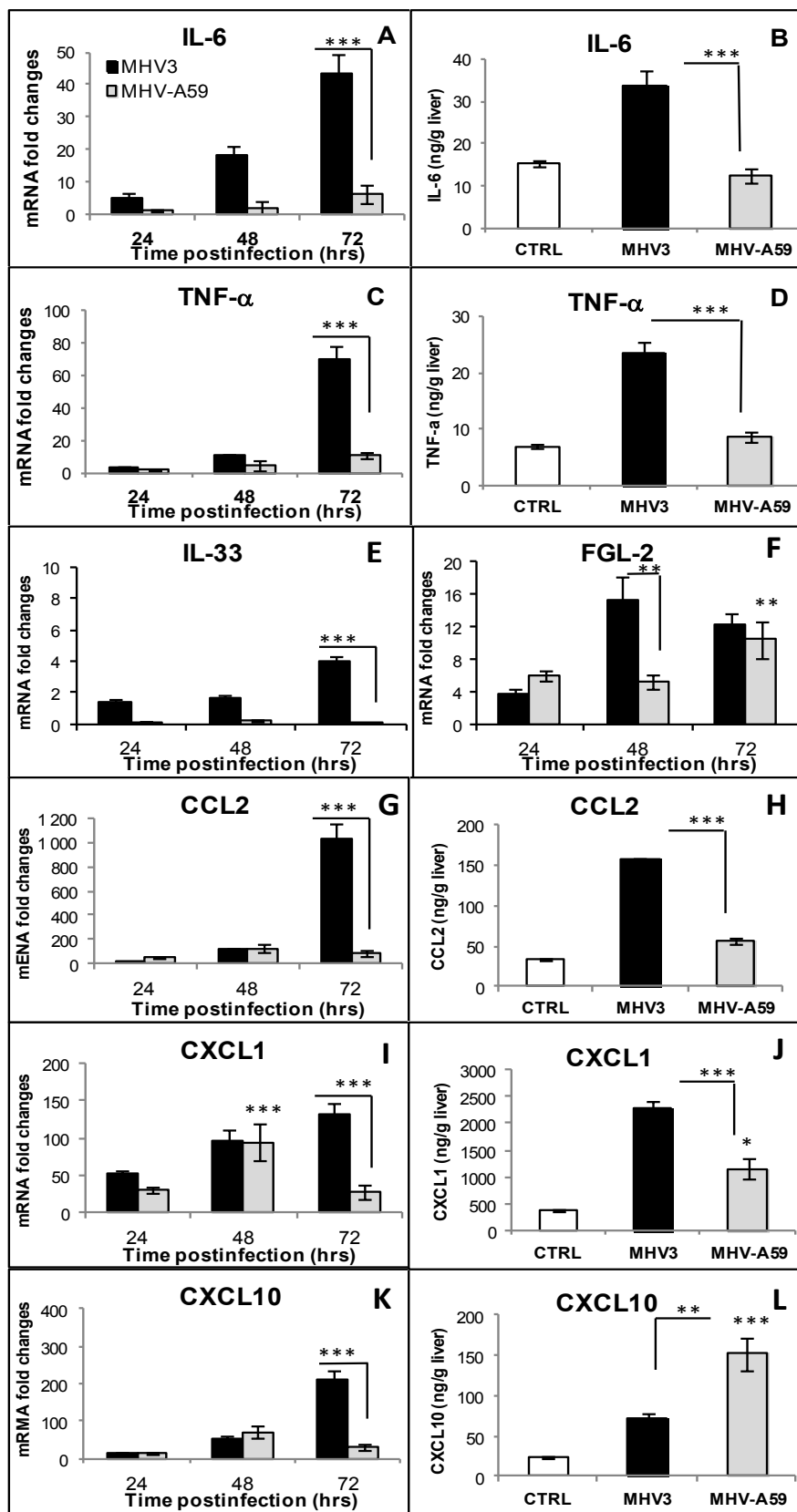
We measured significantly higher TLR2 expression in the liver of MHV3-infected WT mice relative to other PRRs (see Fig. 15A) and we hypothesize that the milder hepatitis induced by the MHV-A59 serotype maybe concurrent to reduced induction of TLR2 expression. As shown in figure 21, TLR-2 expression only increased at 72h p.i. ( $p \leq 0.05$ ) in MHV-A59-infected mice but this response was significantly lower than in MHV3-infected mice (Fig. 15A). Mitigated induction of TLR3, RIG1 and MDA-5 was also apparent in MHV-A59-infected mice ( $p \leq 0.01$  to 0.001).



**Figure 25.** mRNA levels of TLR-2, -4, -3, -7 and helicases MDA-5 and RIG-1 genes in the liver of MHV-A59-infected C57BL/6 mice. Groups of 6 or 7 C57BL/6 mice were i.p. infected with 1000 TCID<sub>50</sub> of MHV-A59. At 24, 48 or 72 h p.i., livers from each group were collected and Toll-like receptors (TLR-2, -3, -4, -7) and helicases (MDA5 and RIG-1) mRNA fold changes were analyzed by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice (arbitrary value of 1) after normalization with HPRT expression. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  when compared with mock-infected mice).



Lower expression of PRRs may account for lower cytokine and chemokine responses in the liver of MHV-A59 infected mice. As shown in figure 22, hepatic transcription and production of IL-6 and TNF- $\alpha$  were lower in MHV-A59-infected mice than in MHV3-infected mice ( $p \leq 0.001$ ) (Figs 22A to D). In addition, no transcription of the alarmin IL-33 and lower and delayed transcription of Fgl2 genes were evidenced in the liver of MHV-A59-infected mice when compared with MHV3-infected mice ( $p \leq 0.01$  to  $0.001$ ) (Figs 22E and F). Finally, very lower or transient levels of CCL2 and CXCL1 gene expression and production were induced in the liver of MHV-A59-infected mice ( $p \leq 0.05$  to  $0.001$  when compared with control group or with MHV3-infected mice) (Figs 22G to J). However, even though gene expression of CXCL10 was lower in the liver of MHV-A59 infected mice, its production was higher when compared to MHV3-infected mice ( $p \leq 0.001$  when compared with control mice;  $p \leq 0.01$  when compared with MHV3-infected mice) (Figs 22K and L). Such higher amounts of CXCL10 proteins despite lower induction of mRNA transcription suggest the release of preformed instead of de novo synthesized CXCL10.



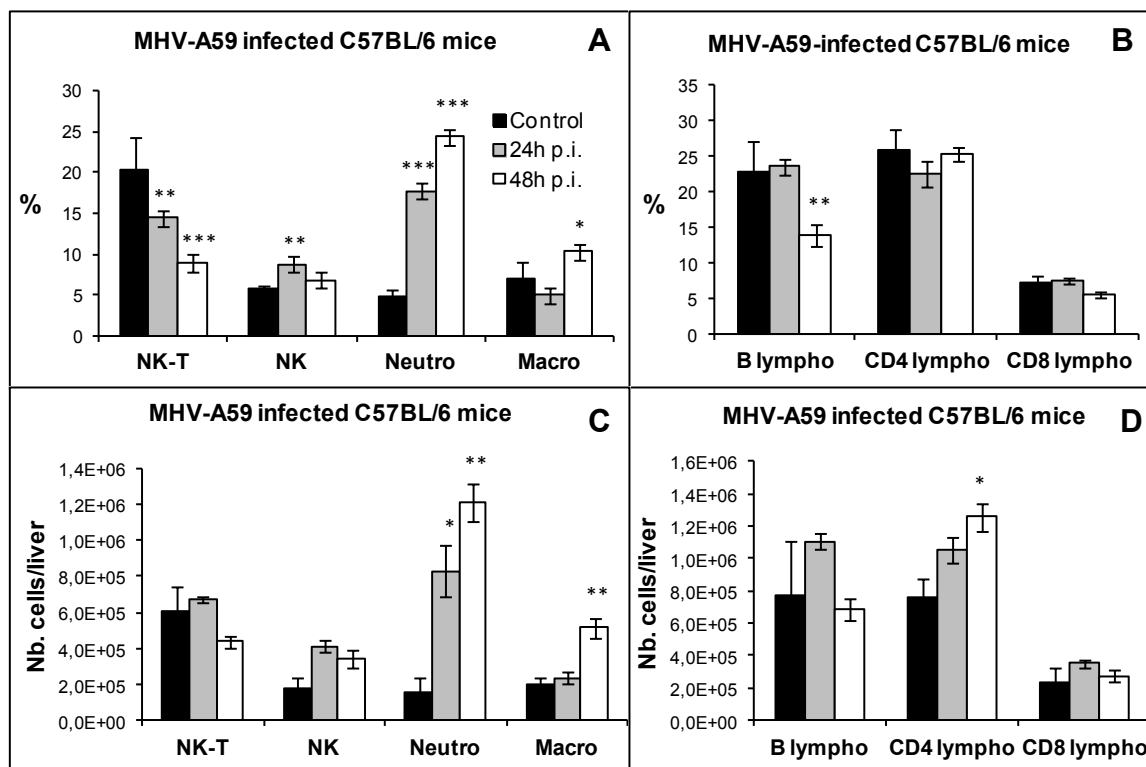
**Figure 26. Inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$ , alarmin IL-33, Fgl2, and chemokines CCL2, CXCL1 and CXCL10 higher decrease in the liver of MHV-A59-infected mice compared to MHV3-infected mice.** Groups of 6 or 7 C57BL/6 mice were i.p. infected with 1000 TCID<sub>50</sub> of MHV3 or MHV-A59. At 24, 48 or 72 h p.i., livers from each group were collected. A-D) mRNA fold increases for IL-6 and TNF- $\alpha$  genes (A and C) evaluated by qRT-PCR at 24, 48 and 72 h p.i., and cytokines levels (B and D), quantified by ELISA tests at 72 h p.i., were compared in livers from MHV3- and MHV-A59-infected mice E-F) mRNA expression levels for IL-33 (E) and Fgl2 (F) were evaluated by qRT-PCR at 24, 48 and 72 h p.i in livers from MHV3- or MHV-A59-infected mice. G-L). mRNA expression levels for CCL2 (G), CXCL1 (I) and CXCL10 (K) were evaluated by qRT-PCR at 24, 48 and 72 h p.i in livers from MHV3- or MHV-A59-infected mice. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice (arbitrary value of 1) after normalization with HPRT expression. Protein levels of CCL2 (H), CXCL1 (J) and CXCL10 (L) were quantified in livers by ELISA test at 72 h p.i. (*\*P* < 0.05; *\*\*P* < 0.01; *\*\*\*P* < 0.001 when compared with respective mock-infected mice or MHV-A59- compared to MHV3-infected mice (underlined)).

#### **3.2.4.9- Higher recruitment of neutrophils, NK cells and macrophages is induced in the liver of TLR2-independent MHV-A59-infected mice**

The higher occurrence of inflammatory cell foci in the liver of MHV-A59-infected mice when compared to MHV3-infected mice (Fig. 20- sect.I-B and C and Fig. 14- sect.II-B to D) suggests a better recruitment of inflammatory cells despite lower chemokine levels. To verify this hypothesis, intrahepatic mononuclear cells were isolated from the liver of MHV-A59-infected mice at 24 and 48 h p.i., immunolabelled and analyzed by cytofluorometry. As shown in figure 23A, neutrophil percentages strongly increased as soon as 24 h p.i. ( $p \leq 0.001$ ) while NK cells transiently increased ( $p \leq 0.05$ ) and NK-T cell decreased ( $p \leq 0.01$  to 0.001). Macrophage percentage slightly increased at 48 h p.i. only ( $p \leq 0.05$ ). In contrast to that seen in the liver of MHV3-infected WT mice, B cell percentage only decreased at 48 h p.i. ( $p \leq 0.01$ ) while no significant reduction in CD4 or CD8 lymphocyte percentages was observed in MHV-A59-infected mice (Fig. 23B). Analysis of absolute numbers of cell subsets only confirmed the recruitment of neutrophils and macrophages. ( $p \leq 0.05$  to 0.01) (Fig. 23C) and revealed an increase in CD4 but not B and CD8 cells at 48h p.i. ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 23D).

Taken together, the subclinical hepatitis and the lower production of inflammatory factors, despite higher numbers in neutrophils, in the liver of TLR2-independent MHV-A59-infected

mice further support the aggravating role of TLR2 in the severity of MHV3-induced fulminant hepatitis.



**Figure 27. Analysis of intrahepatic mononuclear cells in the liver of MHV-A59-infected C57BL/6 mice.** Intrahepatic mononuclear cells were isolated from groups of 6 mock-infected and MHV-A59-infected C57BL/6 mice at 24 and 48 h p.i., immunolabelled with NK1.1, CD3, Gr1, CD11b, CD19, CD4 and CD8 monoclonal antibodies and analyzed by cytofluorometry. A) Percentages of NK-T (NK1.1+CD3+), NK (NK1.1+CD3-), neutrophils (Gr1<sup>hi</sup> CD11b<sup>hi</sup>) and macrophages (Gr1<sup>+</sup> CD11b<sup>int</sup>) cells were evaluated in the liver of infected mice. B) Percentages of B (CD19+), and CD4 (CD3+CD4+) and CD8 (CD3+CD8+) subpopulations of CD3+ NK1.1 cells were similarly analyzed. C-D) Absolute numbers for each cell subset were calculated in using respective percentages reported to total number of isolated mononuclear cells in the liver (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  when compared with respective mock-infected mice).

### 3.2.5- Discussion

In this work, we demonstrate for the first time an aggravating role for TLR2 in the development of acute phase of hepatitis with the MHV3 viral model. Activation of TLR2 can be considered as a major factor in the severity of acute hepatitis as evidenced by earlier mortality, higher hepatic lesions and viral replication in MHV3-infected WT mice and milder or subclinical hepatitis in MHV3-infected TLR2 KO mice and WT mice infected by the MHV-A59 serotype, exhibiting no affinity for TLR2. The severity of hepatitis in MHV3-infected WT mice correlates with higher hepatic expression of TLR2, IFN- $\beta$ , inflammatory cytokines and chemokines and the alarmin IL-33. Despite higher chemokine levels, neutrophils, macrophages, NK, NK-T and T cells were only transiently or weakly recruited in the liver of MHV3-infected WT mice in contrast to higher and sustained cell recruitment in MHV3-infected TLR2 KO or MHV-A59-infected WT mice.

Recently, TLRs have been involved in the pathogenesis and progression of various inflammatory hepatic diseases (reviewed in Broering *et al.*, 2011). PRRs such as endosomal TLR3 or TLR7 and intracytoplasmic helicases RIG-1 or MDA-5 are activated upon exposure to hepatotropic viruses, triggering inflammatory and innate immune responses. Higher TLR2 gene expression was measured in the liver of MHV3-infected WT mice, when compared to other PRRs such as TLR3, RIG-1, MDA-5 or TLR4, suggesting that MHV3 preferentially induces TLR2 transcription in the liver. Similar induction of TLR2 was also noted in the spleen and the brain of MHV3-infected mice (results not shown). Ours is the first study reporting predominance of TLR2 expression over other PRRs in viral hepatitis at early infection. Higher expression of TLR2 has been recently reported in the liver of chronically-infected HCV patients or has been associated with disease progression (Ronit *et al.*, 2013; Tarantino *et al.*, 2013). Levels of hepatic inflammation in HCV and HCV/HIV infected patients correlate with higher hepatic TLR2 and TLR4 gene transcription (Berzsenyi *et al.*, 2011), suggesting a pro-inflammatory role for TLR2 in hepatitis. Accordingly, blocking of TLR2 was recently shown to attenuate ConA-induced experimental hepatitis in mice (Zhou *et al.*, 2014). We have previously demonstrated *in vitro* that MHV3 surface S protein could bind to TLR2 on macrophages in association with heparan sulfate and the MHV specific receptor,

the CEACAM1a molecule (Jacques *et al.*, 2009b; Godfraind & Coutelier, 1998), suggesting that viral fixation to both TLR2 and CEACAM1a may contribute to viral infection and trigger TLR2-dependent inflammatory responses. Enhancement of TLR2 expression by MHV3 may further favor viral fixation to TLR2-positive resident hepatic cells. Such hypothesis is supported by higher viral RNA levels and infectious viral particles in the liver of MHV3-infected WT mice than in TLR2 KO mice. In contrast, Zhou *et al.* (2010) reported no implication of TLR2 in MHV-A59 infection in macrophages. This observation is consistent with lower replication of MHV-A59 in comparison to MHV3 in the liver of WT mice, suggesting a new role for TLR2 in viral replication. Following 24 h p.i., MHV3 RNA and antigens are expressed in the liver primarily by Kupffer and sinusoidal endothelial cells (Décimo *et al.*, 1993; Pereira *et al.*, 1984). Following viral replication and lysis of infected cells, viruses reach hepatocytes leading to extensive syncytia and hepatocellular necrosis (Martin *et al.*, 1994). All these hepatic target cells express TLR2 and release inflammatory factors upon TLR2 activation (Matsumura *et al.*, 2000; Schwabe *et al.*, 2006). Thus, it is tempting to assume that these cells may synergistically increase viral replication in the acute phase of MHV3 infection and aggravate the outcome of hepatitis.

Type I IFN production by infected cells is a major antiviral mechanism acting in the first days of infection. Higher IFN- $\beta$  production was found in the liver of MHV3-infected WT mice when compared to MHV3-infected TLR2 KO mice or MHV-A59-infected WT mice. It has been reported that high levels of type I IFN in peritoneal macrophages from MHV3-infected C57BL/6 mice correlate simultaneously with high viral replication (Schindler *et al.*, 1982), supporting a negligible role of type I IFN in the control of MHV3 replication. Thus, the positive correlation between IFN- $\beta$  production and viral replication levels reflects the spreading of viral infection and damages in the liver. In agreement, lower viral replication and hepatic lesions in MHV3-infected TLR2 KO mice or MHV-A59-infected WT mice correlate with lower IFN- $\beta$  production. In addition, no IFN- $\alpha$  gene expression was induced in the liver of all infected mice despite of higher increase of IRF-7 mRNA (results not shown), supporting low or no antiviral role for type 1 IFN in the control of viral replication and hepatitis.

It was already demonstrated that type I IFN depends mainly on TLR3 and helicases RIG-1 and MDA-5 engagement by viral RNAs in mouse coronavirus infections (Ireland *et al.*, 2008; Roth-Cross *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2011). Transcription levels of TLR3 and RIG-1 were similar in livers of MHV3-infected WT and TLR2 KO mice and lower in MHV-A59-infected WT mice, suggesting that higher production of IFN- $\beta$  in MHV3-infected WT mice does not depend on these PRRs. We can thus postulate that increased IFN- $\beta$  production in the liver of MHV3-infected WT mice may result from MHV3 binding to TLR2. Dietrich *et al.* (2010) have demonstrated that translocation of TLR2 in endolysosomal compartments following ligand engagement triggered IFN- $\beta$  production via MyD88/IRF-1/IRF-7-dependent pathway in macrophages. Future works will be done to address this hypothesis.

The major consequence of TLR2 engagement is the induction of inflammatory cytokines and chemokines through the MyD88-dependent pathway, ultimately leading to activation of NF- $\kappa$ B, and up-regulation of numerous proinflammatory genes such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , chemokines and TLRs (reviewed in Melchjorsen, 2013). MHV3-infected WT mice developed higher TNF- $\alpha$  and IL-6 responses in the liver than MHV3-infected TLR2 KO or MHV-A59-infected mice. It was reported that TNF- $\alpha$  activity is already significant at 24h p.i. in MHV3-infected mice, even though the virus is not yet detectable in the liver (Devictor *et al.*, 1992), suggesting a role for early viral fixation to surface TLR2 in cytokine induction. High hepatic levels of TNF- $\alpha$  are generally associated with extensive necrosis (Schümann *et al.*, 2000). Absence of TNF- $\alpha$ , but not IL-6, was recently shown to significantly reduce hepatic lesions (AST/ALT) and increase the survival of MHV3-infected mice (Liu *et al.*, 2015). Several hepatic cells, as LSECs, hepatic macrophages (KC), hepatocytes and recruited mononuclear cells can produce inflammatory cytokines. Preliminary *in vitro* results revealed that hepatocytes and also LSECs (paper submitted) produce significant levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 when infected by MHV3. Thus, the upregulated production of inflammatory cytokines and chemokines in the liver of MHV3-infected WT mice may be due, at least, to fixation of both viral infectious particles and/or free S proteins produced by infected cells to CEACAM1a- and TLR2-expressing hepatic cells

TLR2 activation also leads to production of chemokines involved in inflammatory cell recruitment. High expression of CXCL1, CCL2, and CXCL10, such as seen in the liver of MHV3-infected WT mice, suggest neutrophils, macrophages and NK or T cell subsets recruitment, respectively (reviewed in Brass & Brenndörfer, 2014). As expected, earlier CXCL1 production and concomitant neutrophil recruitment was found in the liver of MHV3-infected WT mice, indicating that rapid but transient increase in neutrophils may result from early CXCL1 release, as demonstrated by Moles *et al.* (2014). The subsequent loss of neutrophils at 48 h p.i., however, does not depend on decreased CXCL1 production since its levels increased up to 72 h p.i. Our data slightly differ from that of Xu *et al.* (2014) which reported percentage increases of neutrophils (Gr1+CD45+) in the liver of MHV3-infected mice up to 48 h p.i. Such discrepancy results from the dramatic decrease in total intrahepatic mononuclear cells including NK, B and CD4 cells leading to an apparent increase of neutrophil percentages despite reduction of their numbers, such as demonstrated in our work. In addition, these authors linked neutrophil infiltration to TNF- $\alpha$ -dependent Fgl2 production. Our results do not support this hypothesis since chemokine production and neutrophil infiltration in the liver occurred earlier than Fgl2 expression in MHV3-infected WT mice.

We also observed low macrophage recruitment in the liver of MHV3-infected WT mice in contrast to MHV3-infected TLR2 KO and MHV-A59-infected WT mice, despite higher production of CCL2. It was previously demonstrated that macrophage expansion in the liver is related to influx of peripheral monocytes facilitated by high levels of CCL2 rather than higher Kupffer cell numbers (reviewed in Karlmark *et al.*, 2008; Zimmermann *et al.*, 2010). However, resident and recruited macrophages are permissive to MHV3 infection (Décimo *et al.*, 1993; Pereira *et al.*, 1984) and viral replication in macrophages is increased by ligation of MHV3 to TLR2 (Jacques *et al.*, 2009b). Thus, it is plausible that low number of macrophages results from higher viral infection. We can also speculate that macrophages recruited in the liver of TLR2 KO mice are less permissive to lytic viral infection due to the absence of TLR2 expression. In addition, the higher levels of chemokines, such as CXCL1, or cytokines in the liver of MHV3-infected WT mice may directly contribute to hepatotoxicity independently of inflammatory cell infiltration (Stefanovic *et al.*, 2005). Lower levels of chemokines in the liver of MHV3-infected TLR2 KO and MHV-A59-infected WT mice involved sustained



recruitment of neutrophils and macrophages, suggesting that low but sustained recruitment of these cells might be protective rather than deleterious in acute hepatitis process, as supported by lower viral titers, lower inflammation and less damages in these mice. In agreement, it was shown that replication of MHV-A59 in the liver was rapidly controlled by macrophage-mediated production of type I IFN and that depletion of macrophages in infected mice promoted lethal fulminant hepatitis within 4 days p.i. (Wijburg *et al.* (1997). Recent work regarding the respiratory rat coronavirus infection showed that neutrophils were required for an effective antiviral response but could also contribute to lung pathology (Haick *et al.*, 2014). Neutrophils were also shown to contribute to HIV-1 clearance by producing neutrophil extracellular traps (NETs) (Saitoh *et al.*, 2012). Furthermore, sequestered neutrophils in the liver may exhibit anti-inflammatory properties in suppressing inflammatory response of Kupffer cells as reported during systemic bacterial infection (Holub *et al.*, 2009). In the same line, as far as suppressive M2 macrophages were shown to attenuate acetaminophen-induced acute liver injury in mice, we can speculate that macrophage infiltrate in MHV-A59-infected mice or MHV3-infected TLR2KO mice might actually be preferentially polarized towards the M2 phenotype (Zimmermann *et al.* 2012).

In addition, NK, NK-T and B and T lymphocytes only decreased in the liver of MHV3-infected WT mice despite higher production of CXCL10 by hepatocytes. Such reduction may result from permissivity of these cells to viral infection, such as previously reported (Jolicoeur & Lamontagne, 1989; Lamontagne & Jolicoeur, 1991; Lehoux *et al.*, 2004). Moreover, MHV3 infection was reported to decrease hepatic CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Tregs (Jacques *et al.*, 2008), involved in liver tolerance. Since CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells were not decreased in the liver of TLR2KO mice, TLR2 may play a major role in the loss of T cell subsets and impair T cell-mediated antiviral defense during MHV3 infection. Previous works with the highly attenuated YAC-MHV3 variant have shown that the low decrease of macrophages and increase of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in the liver during infection led to viral elimination and subsequent recovery (Lamontagne & Jolicoeur, 1991). Moreover, as high CXCL10 levels were associated with apoptosis of human and murine hepatocytes (Sahin *et al.*, 2013), its higher induction in MHV3-infected WT mice may also contribute to aggravate hepatitis.

On the other hand, we have observed that IL-33 and Fgl2 induction was less dependent on TLR2 but rather reflected levels of liver damages. IL-33 is an alarmin associated with liver injury (Wang *et al.*, 2012a., 2012b). We have recently reported that IL-33 expression was up-regulated in the liver of MHV3-infected C57BL/6 mice, mainly in liver sinusoidal endothelial cells, vascular endothelial cells and hepatocytes in the first 24 to 32 h p.i. (Arshad *et al.*, 2013). This study also showed that TLR3 was involved in upregulation of IL-33 in poly (I : C)-treated mice. However, IL-33 expression was higher induced in the liver of MHV3-infected WT mice than in poly (I:C)-treated mice, suggesting that other PRRs might be involved in IL-33 production during MHV3 infection. We have shown that IL-33 expression was reduced at 24 h p.i. only in MHV-infected TLR2KO mice, minimizing the role of TLR2 in IL-33 induction. The mechanism(s) by which MHV3 favors IL-33 is pending and needs further investigation.

Fgl2 converts prothrombin to thrombin leading to fibrin deposition in microvessels, favoring hepatocyte necrosis during MHV3 infection (Ding *et al.*, 1997). The increase of Fgl2/fibroleukin gene expression in the liver reflects microvascular thrombosis. In spite of the worsening role of Fgl2 activation in acute MHV3 hepatitis (Marsden *et al.*, 2003), Fgl2 expression levels were comparable in both MHV3-infected WT and TLR2 KO mice or remained low and/or delayed in MHV-A59 infected WT mice, indicating that this factor may not be regulated by TLR2.

The present work highlights the complex interactions between both surface TLR2 and intracellular TLRs and helicases in the recognition of viral infections, the antiviral efficiency of inflammatory responses and viral evasion mechanisms in the onset of hepatic damages. Such delicate balance can lead to resolution of hepatitis in the acute phase or, on the contrary, favor chronic hepatitis. Further work is needed to clarify whether viral activation of TLR2 signalling increases or rather accelerates hepatitis process. However, delayed recruitment of inflammatory cells and cytokine release in MHV3-infected TLR2KO suggest that TLR2 accelerates inflammation-mediated liver damage. Evaluation of liver inflammation and hepatitis progression for a prolonged period of time (over 3 days) in TLR2 KO mice would confirm or not this hypothesis. Upregulation of TLR2 has been observed in monocytes from

patients with chronic hepatitis C and such increased expression correlated with higher TNF- $\alpha$  level and necroinflammatory activity in the liver (Riordan *et al.*, 2006). Consistent with these observations Berzsenyi *et al.* (2011) have reported that hepatic TLR2, TLR4 and TNF- $\alpha$  mRNA levels were associated with hepatic inflammation in both HCV and HCV/HIV infections. In addition, TLR2 expressed on monocytes and T cells was shown to contribute to disease progression in chronic HCV infection (Ronit *et al.*, 2013). Our data demonstrate for the first time the dysregulating activity of TLR2 on inflammatory response in the acute phase of viral hepatitis. The use of MHV3 murine model of acute viral hepatitis can thus be helpful to dissect early aggravating factors that may contribute to the development of chronic hepatitis.

Further work is in progress to determine the mechanisms involved in TLR2-dependent inflammatory cytokines/chemokines and type I IFN production in infected intrahepatic resident and recruited inflammatory cell populations.

### **3.2.6- Acknowledgments**

The authors want to acknowledge Pascale Bellaud and Eric Massicotte for their technical assistance within histochemistry and cytofluorometry analyses.

NB. Les références citées dans cet article ont été incluses dans la section bibliographie de la thèse.

### **3.3- Article 3 : Brain invasion by mouse hepatitis virus depends on impairment of tight junctions and interferon- $\beta$ production in brain microvascular endothelial cells**

Cet article a été publié dans la revue *Journal of Virology* (doi:10.1128/JVI.01501-15)

À titre d'auteur principal, j'ai fait une contribution majeure à cet article. J'ai contribué de manière significative à la conception du projet, à la recherche et la mise au point des méthodes, à la réalisation de la majorité des protocoles expérimentaux (90%), à l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article sous la supervision et la correction de Dre Lamontagne. Aveline Filliol, étudiante au doctorat en co-direction avec ma directrice de recherche et son directeur, Dr. Michel Samson, ont contribué à la réalisation des analyses histologiques et à la révision du manuscrit.

À : Bleau, Christian

Objet : Final Decision made for JVI01501-15R1

Dear Mr. Bleau:

Here is a copy of the decision letter for manuscript "BRAIN INVASION BY MOUSE HEPATITIS VIRUS DEPENDS ON IMPAIRMENT OF TIGHT JUNCTIONS AND INTERFERON- $\beta$  PRODUCTION IN BRAIN MICROVASCULAR ENDOTHELIAL CELLS" by Christian Bleau, Aveline Filliol, Michel Samson, and Lucie Lamontagne (JVI01501-15R1), for which you were a contributing author.

Sincerely,

Stanley Perlman  
Editor, Journal of Virology

-----  
Subject: JVI01501-15R1 Decision Letter

Prof. Lucie Lamontagne  
Université du Québec à Montréal  
Sciences Biologiques  
C.P. 8888 Succ. Centre-Ville  
Montréal, Quebec H3C3P8  
Canada

Re: JVI01501-15R1 (BRAIN INVASION BY MOUSE HEPATITIS VIRUS DEPENDS ON IMPAIRMENT OF TIGHT JUNCTIONS AND INTERFERON- $\beta$  PRODUCTION IN BRAIN MICROVASCULAR ENDOTHELIAL CELLS)

Dear Prof. Lucie Lamontagne:

Your manuscript has been accepted, and I am forwarding it to the ASM Journals Department for publication. Thank you for submitting your paper to JVI.

Sincerely,  
Stanley Perlman  
Editor, Journal of Virology

**BRAIN INVASION BY MOUSE HEPATITIS VIRUS DEPENDS ON IMPAIRMENT  
OF TIGHT JUNCTIONS AND INTERFERON- $\beta$  PRODUCTION IN BRAIN  
MICROVASCULAR ENDOTHELIAL CELLS**

**Christian Bleau<sup>1</sup>, Aveline Filliol<sup>2</sup>, Michel Samson<sup>2</sup>, and Lucie Lamontagne<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Department of Biological Sciences, Université du Québec à Montréal, Montreal Canada, H3C 3P8 ; <sup>2</sup>Institute of Research in Environmental and Occupational Health, IRSET, U. 1085 Inserm, Université de Rennes 1, 35043 Rennes, France*

**Corresponding author**

Dre Lucie Lamontagne DMV, Ph.D.  
Département des Sciences Biologiques  
Université du Québec à Montréal  
C.P. 8888 Succ. Centre-Ville  
Montréal, Qué, Canada H3C 3P8

**Running title: Blood-brain barrier breakdown by MHV3 depends on lack of IFN- $\beta$**

**Key words:** brain microvascular endothelial cell, coronavirus, innate immunity, tight junction proteins, interferon- $\beta$ .

### 3.3.1- Abstract

Coronaviruses (CoVs) have shown neuroinvasive properties in human and animal secondary to replication in peripheral organ but the mechanism of neuroinvasion is unknown. The major aim of our work was to evaluate the ability of CoVs to enter the central nervous system (CNS) through the blood brain barrier (BBB). Using the high hepatotropic mouse hepatitis virus (MHV) type 3, its attenuated variant 51.6-MHV3, showing low tropism for endothelial cells, and the low hepatotropic MHV-A59 strains from murine coronavirus group, we investigated the viral-induced dysfunctions of BBB *in vivo* and in brain microvascular endothelial cells (BMECs) *in vitro*. We report here a MHV strain-specific ability to cross the BBB during acute infection according to their virulence for liver. Brain invasion was only observed in MHV3-infected mice and correlated with enhanced BBB permeability associated with decreased expression of ZO-1, VE-cadherin and occludin but not claudin-5 in the brain or in cultured. BBB breakdown in MHV3 infection was not related to production of barrier-dysregulating inflammatory cytokines or chemokines by infected BMECs but rather to downregulation of barrier protective IFN- $\beta$  production. Our findings highlight the importance of IFN- $\beta$  production by infected BMECs in preserving BBB function and preventing access of blood-borne infectious viruses to the brain.

#### ***Importance***

Coronaviruses (CoVs) infect several mammals including humans and are associated with respiratory, gastrointestinal and/or neurological diseases. Some evidences suggest that human respiratory CoVs may show neuroinvasive properties. Indeed, the SARS-CoV, causing severe acute respiratory syndrome, and the CoVs OC43 and 229E were found in the brains of SARS and multiple sclerosis patients respectively. These finding suggest that hematogenous spread CoVs may gain access to CNS at the BBB level. Herein we report for the first time that CoVs exhibit ability to cross the BBB according to strain virulence. BBB invasion by CoVs correlates with viral-induced disruption of tight junctions on BMECs, leading to BBB dysfunction and enhanced permeability. We provide evidence that production of IFN- $\beta$  by BMECs during CoV infection may prevent BBB breakdown and brain viral invasion.

### 3.3.2- Introduction

The blood-brain barrier (BBB) is a highly selective barrier critical for central nervous system (CNS) homeostasis in controlling peripheral blood-brain exchanges and preventing access of neurotoxins and pathogens to the CNS. The functional and structural integrity of the BBB mainly relies on specific features of the brain microvascular endothelial cells (BMECs) lining the brain capillaries. These cells are tightly connected by a unique assembly of adherens junctions composed of transmembrane cadherin and tight junction complexes (e.g. claudins and occludin) anchored to actin filaments via adaptor molecules such as *zona occludens* (ZO) (Spindler & Hsu, 2012).

The BBB is known to provide significant protection against hematogenous spread viruses as several viruses inoculated in periphery are shown to only induce neuropathology following mechanically- or chemically-mediated disruption of the BBB (Hase *et al.*, 1990; Kobiler *et al.*, 1989; Lustig *et al.*, 1992). However, some infectious blood-borne viruses primarily targeting peripheral organs have evolved strategies to thwart the BBB including direct infection of BMECs, « Trojan horse » invasion via the traffick of infected immune cells in the CNS or paracellular entry through alteration of tight junctions (Spindler & Hsu, 2012). Disruption of tight junctions, resulting from either viral products or host immune factors (Afonso *et al.*, 2007; Chai *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2004), may lead to an increase in extravasation of immune cells and poorly regulated flux of molecules as well as ions across the BBB which are critical events in neuropathogenesis (Obermeier *et al.*, 2013).

Coronaviruses (CoV) are enveloped positive single-stranded RNA viruses that infect several mammals, including humans. Some evidences suggest that respiratory CoVs may show neuroinvasive properties. The SARS-CoV, causing severe acute respiratory syndrome in humans (SARS), as well as the human CoVs OC43 and 229E were found in the brains of SARS and multiple sclerosis patients respectively (Arbour *et al.*, 2000; Gu *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 1992; Stewart *et al.*, 1992). However the mechanism of neuroinvasion by hematogenous spread CoVs is elusive.



The mouse hepatitis virus (MHV) coronavirus group induces hepatic, respiratory or enteric diseases followed by neurological disorders according to serotypes (Cowley & Weiss, 2010), and thus represents a relevant animal model for the study of neuroinvasion by CoVs. The high hepatotropic MHV3 is known as the most virulent MHV strain causing fulminant hepatitis and death of susceptible C57BL/6 mice within 3-5 days postinfection (p.i.) (Virelizier *et al.*, 1975) and neurological disease following nonlethal hepatitis in semisusceptible C3H mice characterized by meningitis, ependymitis, and encephalitis beginning 3 to 4 weeks p.i. after intraperitoneal (i.p.) infection (Tardieu *et al.*, 1982; Virelizier *et al.*, 1975). This suggests brain invasion by MHV3 through the BBB endothelium in the acute phase of infection. The attenuated 51.6-MHV3 variant has lost the ability to replicate in liver endothelial cells (Martin *et al.*, 1994) and induces acute hepatitis and death of susceptible C57BL/6 mice within 5-9 days p.i. (Jacques *et al.*, 2008), suggesting an important role for endothelial cells in disease outcome. The low hepatotropic MHV-A59 causes no mortality and moderated hepatitis without neurological disease in C57BL/6 mice when i.p. inoculated (Lavi *et al.*, 1986). Brain invasion and disease by the MHV-A59 serotype is however enabled following intranasal infection and depends on the olfactory nerve instead of BBB as portal of viral entry into the CNS (Barnett & Perlman, 1993; Lavi *et al.*, 1986), suggesting a restriction of CNS invasion at the BBB level (Godfraind *et al.*, 1997; Lavi *et al.*, 1986).

BMECs were already reported as potential cell targets for MHVs as they express the MHV receptor: the carcinoembryonic antigen 1a (CEACAM1a) (Belouzard *et al.*, 2012). Primary mouse BMECs were shown to support MHV3 replication *in vitro* (Joseph *et al.*, 1995) but conflicting results regarding viral replication of MHV-A59 in BMECs have been reported (Godfraind & Coutelier, 1998; Godfraind *et al.*, 1997; Lavi *et al.*, 1999). Since all MHV strains use the same cell receptor CEACAM1a, and both MHV3 and MHV-A59 can bind to BMECs (Godfraind *et al.*, 1997; Joseph *et al.*, 1995), other factor(s) may be involved in BBB invasion or not according to MHV serotype.

We demonstrated here that the high hepatotropic MHV3 strain but not MHV-A59 or 51.6-MHV3 variant elicited an *in vivo* and *in vitro* breakdown of functional and structural integrity of the BBB, enabling viral invasion of the brain. MHV strain-specific ability to cross the BBB

during liver acute infection correlated with enhanced BBB permeability due to alteration of tight junctions ZO-1, VE-cadherin and occludin but not claudin-5 expression on BMECs. Barrier disruption in MHV3 infection was not related to the release of inflammatory cytokines or chemokines by infected BMECs but rather to a downregulation of barrier protective IFN- $\beta$  production.

### **3.3.3- Material and methods**

#### **3.3.3.1- Mice**

Female C57BL/6 (Charles River, St-Constant, Qc, Canada) mice were housed in a HEPA-filtered air environment. All experiments were conducted with mice between 8 to 10 weeks of age in compliance with the regulations of the Animal Committee of the University of Quebec in Montreal.

#### **3.3.3.2- Viruses**

Highly pathogenic MHV3 is a cloned substrain isolated from the liver of infected DBA2 mice and maintained in L2 cells for less than three passages, as described previously (Dupuy & Rodrigue, 1981). The mildly virulent MHV-A59 strain was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). The low virulent 51-6-MHV3 is an escape mutant, selected from the pathogenic MHV3 virus in the presence of S protein-specific A51 and A37 monoclonal antibodies, having lost tropism for liver sinusoidal endothelial cells (Martin *et al.*, 1994). All viruses were produced in L2 cells and their pathogenic properties were assessed routinely.

#### **3.3.3.3- Cells**

bEnd.3 (ATCC, CRL-2390), an immortalized mouse brain endothelial cell line, was cultured in RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS and antibiotics (Wysent, St-

Bruno, Qc, Canada). Freshly trypsinized bEnd.3 cells were seeded in collagen-treated 24-well plates at  $6 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> or collagen-treated 6.5 mm diameter Transwell polycarbonate membrane inserts (Fisher Sci., Ont., Canada) and incubated until confluence. Cells were then infected with 0.1 multiplicity of infection (MOI) of MHV3, MHV-A59 or 51.6-MHV3 for 24-72h or up to 8 days according to experiments. In some experiments, cells were concomitantly treated with IFN- $\beta$  (100 pg/mL) or anti-IFN- $\beta$  (1  $\mu$ g/mL) (R&D systems, Minneapolis, MN). Cell culture supernatant was collected for ELISA assays and virus titration and total RNA was extracted for qRT-PCR analyses. *In vitro* studies were conducted in triplicate.

#### **3.3.3.4- *In vivo* viral infections**

Groups of 6 wild type C57BL/6 mice were infected intraperitoneally (i.p.) with  $10^3$  TCID<sub>50</sub> of MHV3, MHV-A59 or 51.6-MHV3. Mock-infected mice received a similar volume of PBS (Wysent, St-Bruno, Qc, Canada). Mice were sacrificed by CO<sub>2</sub> anoxia 72h post-infection (p.i.). The brain and liver were collected and frozen at -80°C for further analyses.

#### **3.3.3.5- RNA isolation and RT-qPCR**

Total RNA from frozen brain samples was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Burlington, Ont., Canada) and residual genomic DNA was removed with the Turbo DNA-free kit (Ambion, Austin, TX). RNA from bEnd.3 cells was extracted using NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA) according to the manufacturer procedure. One  $\mu$ g of RNA was retro-transcribed into cDNA using the High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Real time PCR amplification was carried out on 25ng cDNA using the HotStart-IT™ SYBR® Green qPCR Master Mix (USB Corporation, Cleveland, OH) on a ABI 7300 system (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primer sets used are listed in Table 1 (supplemental). Threshold cycle values (Ct) were collected and used for “ $\Delta\Delta C_t$ ” analysis. The relative gene expression was normalized to HPRT as endogenous control and expressed as a ratio to gene expression in mock-infected mice or bEnd.3 cells. The specificity of the PCR products was confirmed by melting curve analyses. All qPCR analyses of samples from *in vitro* and *in vivo* experiments were run in duplicate.

**Table III : Primer sets used for quantitative reverse transcription-PCR**

<b>Gene</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>
HPRT	5'-GAAAGACTTGCTCGAGATGTCATG-3'	5'-CACACAGAGGGCCACAATGT-3'
IFN- $\beta$	5'-CGGACTTCAAGATCCCTATGGA-3'	5'-TGGCAAAGGCAGTGTAACCTCTC-3'
IL-6	5'-TCGGAGGCTTAATTACACATGTTC-3'	5'-TGCCATTGCACAACCTCTTTTCT-3'
TNF- $\alpha$	5'-TCCCAGGTTCTCTTCAAGGGA-3'	5'-GGTGAGGAGCACGTAGTCGG-3'
CCL2	5'-GCAGCAGGTGTCCCAAAGAA-3'	5'GGTCAGCACAGACCTCTCTCTTG-3'
CXCL10	5'-GGCCATAGGGAAGCTTGAAAT-3'	5'-TCGTGGCAATGATCTCAACAC-3'
Occludin	5'- TGTGGGATAAGGAACACATTTATGA-3'	5'- CAGACACATTTTTTAACCCACTCTTCA-3'
Claudin-5	5'-TCTGCTGGTTCGCCAACAT-3'	5'- CGGCACCGTCGGATCA-3'
ZO-1	5'- TGAACGCTCTCATAAGCTTCGTAA-3'	5'- ACCGTACCAACCATCATTATTG-3'
VE-cadh	5'- GCGCAGCATCGGGTACTC-3'	5'- GCTTGGTTATTTCGGAAGAATTGG-3'
MHV-N	5'-TGGAAGGTCTGCACCTGCTA-3'	5'-TTTGGCCCACGGGATTG-3'

### 3.3.3.6- ELISA assays

Determination of IFN- $\beta$  (PBL, Piscataway, NJ), IL-6, TNF- $\alpha$  (BD, Mississauga, Ont., Canada) CXCL10, CCL2 (eBiosciences, San Diego, CA) and CXCL1 (R&D systems Minneapolis, MN) levels in bEnd.3 cell culture supernatants was carried out according to the manufacturer's procedures.

### 3.3.3.7- Virus titration

Virus titration was performed on brain lysates from infected mice and infected bEnd.3 cell culture supernatants by 10-fold serial-dilution on L2 cell monolayers cultured in 96-well plates. Cytopathic effects, characterized by syncytia and cell lysis, were recorded at 72h p.i. and virus titers were determined according to Reed-Muench method and expressed as  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>.

### 3.3.3.8- *In vivo* assessment of BBB integrity

Changes in blood–brain barrier permeability were assessed using sodium fluorescein (NaF) (Sigma Aldrich) as previously described (Phares *et al.*, 2006). Briefly, mice were infected for 72h and i.p. injected with 100  $\mu$ l of 10% NaF in PBS 1h prior to euthanasia. Cardiac blood was collected, followed by transcardial perfusion with 15 ml PBS and brains were removed, weighted and homogenized in PBS (1:10 g/vol). NaF content was measured on a microplate fluorometer Synergy 4 (Biotek, Winooski, VT) with excitation at 485 nm and emission at 530 nm using standards ranging from 0.78  $\mu$ g/ml to 5  $\mu$ g/ml. NaF concentration in the brain was normalized to serum NaF concentrations for each mouse to allow comparisons among mice and calculated as follow: ( $\mu$ g NaF in the brain/mg of brain)/( $\mu$ g NaF in sera/ $\mu$ l blood). Data are expressed as fold increase in fluorescence by comparison with levels from uninfected mice.

### 3.3.3.9- siRNA transfections

bEnd.3 cells were seeded in collagen-treated 24-well plates at 60 000 cells/ml and transfected with 25 nM of siRNA Flexitude premix (Qiagen, Cambridge, MA) targeting TLR2 mRNA (target sequence: CTCGTTCTCCAGCATTAAA), CEACAM1a mRNA (target sequence: CACACTCATGCATTCCTACTCTA) caveolin-1 mRNA (target sequence: ATGGTTTGTCTTGATCAAGAA) clathrin mRNA (target sequence: CACGTGTTATGGAGTATATTA) or with the AllStars Negative Control siRNA (Qiagen, Cambridge, MA) as nonsilencing transfection control for 36h prior to infections.

### 3.3.3.10- Transendothelial electrical resistance (TEER) and *in vitro* permeability assays

bEnd3 monolayers were grown on collagen-treated 6.5 mm diameter Transwell polycarbonate membrane inserts (0.4  $\mu\text{m}$  pore size,  $6 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>; Costar, Corning, Tewksbury, MA) assembled into 24-well plates and infected for 24-72h. TEER ( $\Omega\cdot\text{cm}^2$ ), reflecting barrier integrity, was recorded using an EVOM volt ohmmeter (World Precision Instruments, Sarasota, FL) and calculated by subtracting the resistance of blank inserts from that of the inserts with cells and multiplying the subtracted values by the area of the insert. Barrier function was further analyzed by measuring the permeability of the cell monolayer to sodium fluorescein (NaF) (MW = 376 Da) and Evans blue (EVB)-labeled albumin (MW = 67 kDa) (Sigma Aldrich, St-Louis, MO). Ringer-HEPES was added to the abluminal side while the luminal side was loaded with Ringer-HEPES containing 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  NaF, 170  $\mu\text{g}/\text{ml}$  EVB and 10 mg/ml BSA. Cells were incubated at 37°C for 30min and levels of NaF and EVB in the abluminal side were measured using a fluorometer (Biotek, Winooski, VT) with an excitation/emission wavelength ratio of 485/530 nm for NaF and 540/680 nm for EVB. NaF and EVB concentrations were determined using a standard curve.

### 3.3.3.11- Immunocytochemistry

bEnd.3 cells were seeded in collagen-treated 2-well Labtek chamber slides and infected for 48h. Cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde (PFA) for 10 min at RT, permeabilized with 0.3% Triton X-100 and blocked with 3% BSA. Cells were incubated with primary antibodies (ZO-1, occludin and VE-cadherin: 1:100, all from LSBio, Seattle, WA) overnight at 4°C and then incubated with FITC-labeled goat anti-rabbit secondary antibody (1: 500, 1h RT) and mounted in antifade media containing DAPI counterstain (Invitrogen, Ont., Canada). Fixed cells were imaged with a Zeiss LSM700 Statif-Observer Z1 confocal microscope (63x) (Zeiss, Toronto, Ont., Canada) and analyzed using ZEN 2009 software. For brain immunolocalization of ZO-1, VE-cadherin and occludin, paraformaldehyde-fixed and paraffin-embedded mouse brain sections (5  $\mu\text{m}$ ) followed by antigen retrieval were incubated with primary antibodies (1, 2.5, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  respectively, all from LSBio, Seattle, WA) for 1 h in a Ventana automated machine (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ), and secondary

antibody: OmniMap anti-Rabbit-HRP (RUO) for 16 min. Slides were then counterstained for 16 min with hematoxylin.

### **3.3.3.12- Statistical analyses**

Data are expressed as means  $\pm$  the standard error of the mean. *In vitro* statistical analyses were performed with Student's t-test comparing mock- to MHV-infected cells or in experiments with siRNAs, treated MHV-infected cells to untreated MHV-infected cells. *In vivo* statistical analyses were realized with a one-way ANOVA test followed by a *posthoc* Tukey analysis using the software PASW version 18 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL). Groups of MHV-infected mice were compared to mock-infected mice or MHV3-infected mice were compared to MHV-A59- and 51.6-MHV3-infected mice according to experiments. Values of  $p \leq 0.05$  were considered as significant.

### **3.3.4- Results**

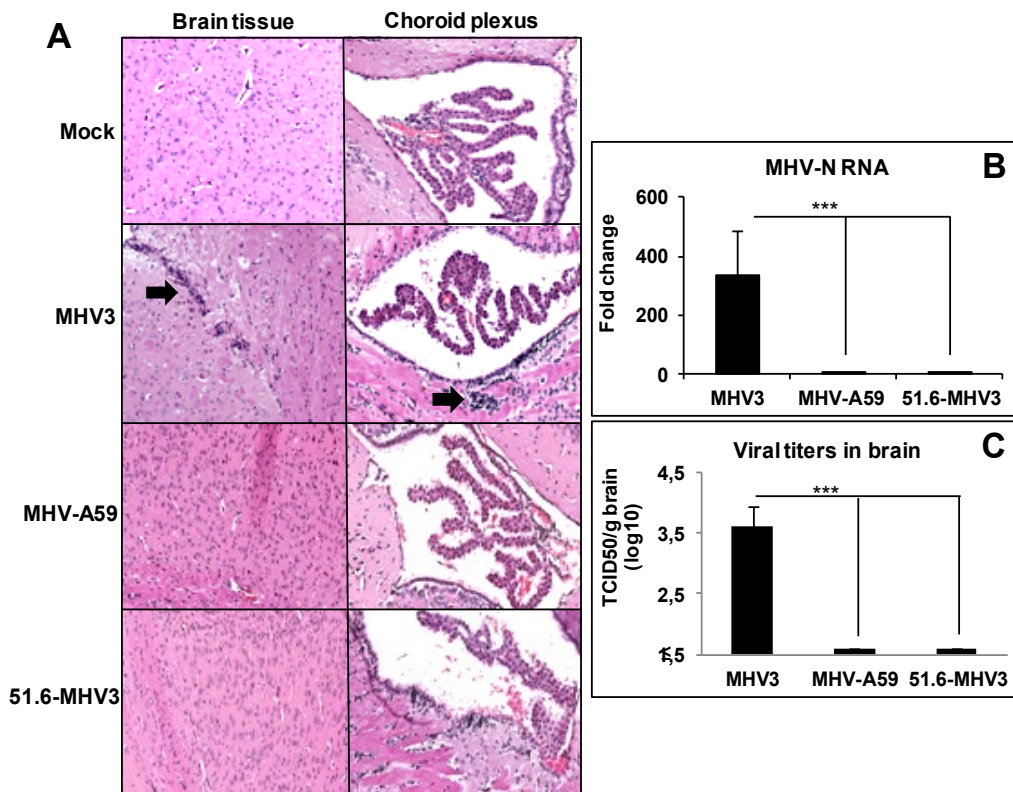
#### **3.3.4.1- Brain invasion by hematogenous spread MHVs correlates with strain virulence and tropism for liver**

The discrepancies regarding brain invasion by the high hepatotropic MHV3 and the low hepatotropic MHV-A59 following hematogenous spread of viruses (i.p. inoculation) suggest strain-specific abilities to traffick across the BBB (Virelizier *et al.*, 1975; Tardieu *et al.*, 1982; Godfraind *et al.*, 1997; Lavi *et al.*, 1999; Tardieu *et al.* 1986). To verify this hypothesis, C57BL/6 mice were i.p. infected for 72h with MHV3, its attenuated 51.6-MHV3 variant or MHV-A59, and the brains were harvested, stained for histopathological analyses and assayed for viral detection. Examination of HE-stained brain sections revealed low presence of inflammatory cells in the meninges, the microvasculature and the ependymal tissue lining the ventricles in the brain from MHV3-infected mice (Fig. 7A). No inflammatory cells or abnormalities in the neural tissue and choroid plexus were detectable in brains from 51.6-MHV3- or MHV-A59-infected mice. In addition, no multinucleate or rounding cells usually

observed in liver from MHV-infected mice were noted in brain from all infected mice. Histopathological analysis of the liver was also done from 24 to 72h p.i. to confirm that viral infection firstly occurred in the liver following i.p. inoculation in all groups of mice. Multiple foci of inflammatory infiltrations and hepatocyte necrosis were noted as soon as 24h p.i. and extended until 72h p.i. in liver from MHV3-infected mice while only few localized foci of necrotic cells were present in the liver of MHV-A59 or 51.6-MHV3-infected mice (results not shown).

Trafficking of virus to the brain was assessed by detection of MHV nucleoprotein (N) RNAs and titration of infectious particles. Viral RNAs and virus titers were detected only in the brains of high hepatotropic MHV3-infected mice, while no evidence of replication of MHV-A59 and 51.6-MHV3 was noted (Figs. 7B and C). Viral replication level in the brain after 72 h p.i. was however too low to permit significant immunolabelling of virally-infected cells. Similarly, infectious viruses were titrated at 72 h p.i. in the liver of all groups of mice and demonstrated that MHV3 replicated higher ( $6.3 \pm 0.1 \text{ Log}_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{g liver}$ ) than MHV-A59 ( $3.9 \pm 0.16 \text{ Log}_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{g liver}$ ) and 51.6-MHV3 ( $3.6 \pm 0.17 \text{ Log}_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{g liver}$ ). These results suggest that only the high hepatotropic MHV3 may have the ability to invade the brain by hematogenous spread and to cross the BBB.





**Figure 28. Brain invasion by hematogenous spread MHVs correlates with virulence.** A) Groups of 6-7 mice were i.p. mock-infected (PBS) or infected with 1000 TCID<sub>50</sub> (tissue culture infective dose 50 %) of MHV3, MHV-A59 and 51.6-MHV3 for 72 h and harvested brains were subjected to hematoxylin-eosin-safranin staining for histopathological analyses; B-C) Viral detection of MHV3, MHV-A59 and 51.6-MHV3 at 72h p.i. in brain samples of infected mice determined by qRT-PCR analysis of the viral nucleoprotein (N) expression and viral titration (TCID<sub>50</sub>). Viral detection threshold is 1.6 TCID<sub>50</sub>/ml (\*\*\*)  $P < 0.001$

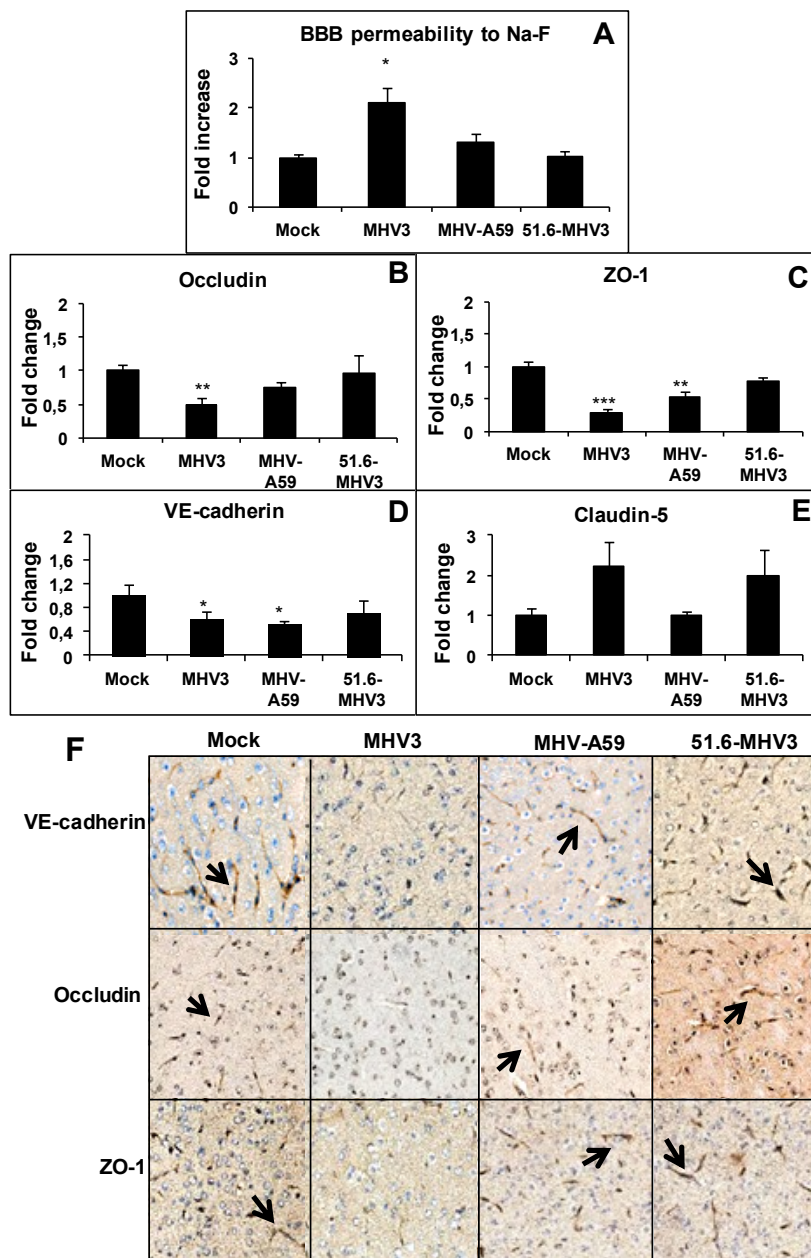
### 3.3.4.2- Breakdown of the BBB and alteration of tight junctions only occur in the brain of high hepatotropic MHV3-infected mice.

To further investigate whether MHV3 but not 51.6-MHV3 or MHV-A59 viral replication in the brain following liver infection was due to a breakdown of the BBB, assessment of BBB permeability was performed in mice infected for 72h with each virus and injected i.p. with 10% NaF dye 1 h prior to euthanasia. The leakage of NaF from the peripheral circulation into the brain is allowed only when the BBB is compromised (Yen *et al.*, 2013). As shown in figure 8A, NaF levels increased in brain from MHV3-infected mice, indicating a breakdown

of the BBB ( $p \leq 0.05$ ). No significant difference in NaF uptake was observed in mice infected with MHV-A59 and 51.6-MHV3.

Since tight junction integrity is crucial for maintaining the function of the BBB, we asked whether breakdown of the BBB following MHV3 infection resulted from decrease in tight junction proteins. To assess this, mRNA expression of tight junctions (claudin-5, VE-cadherin, occludin, and ZO-1) was evaluated in the brains of infected mice at 72h p.i. by qRT-PCR. When compared to brains from mock-infected mice, expression level of occludin mRNA was significantly reduced by about 50% in brains from MHV3- but not MHV-A59 or 51.6-MHV3-infected mice ( $p \leq 0.01$ ) (Fig. 8B). The VE-cadherin and ZO-1 mRNA expressions were also impaired in the brain of MHV3-infected mice and at a lesser extent in MHV-A59-infected mice ( $p \leq 0.05$  to  $0.01$ ), but not in 51.6-MHV3-infected mice (Figs 8C and D). No significant change in claudin-5 expression was evidenced in mice infected with either virus (Fig. 8E).

To confirm that reduction in tight junction proteins mRNA expression in the brain was in accordance with a concomitant decrease in protein expression, IHC stainings using specific antibodies to each protein were conducted on brain tissue. VE-cadherin, occludin and ZO-1 staining intensity decreased in brain microvessels from MHV3-infected mice when compared to brains from mock-infected mice, as shown by the arrows (Fig. 8F). Lower reduced expression of VE-cadherin and ZO-1 was also detected in the brain of MHV-A59-infected mice while no change in tight junction expression was induced by 51.6-MHV3 infection.



**Figure 29. MHV3, but not MHV-A59 and 51.6-MHV3, induces BBB breakdown.** Groups of 6-7 mice were i.p. mock-infected (PBS) or infected with 1000 TCID<sub>50</sub> of MHV3, MHV-A59 and 51.6-MHV3 for 72 h. A) Determination of BBB permeability assessed by sodium fluorescein (NaF) uptake 1 h prior to euthanasia. B-E) mRNA expression of occludin (B), ZO-1 (C), VE-cadherin (D) and claudin-5 (E) was evaluated in brain samples by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to mock-infected mice after normalization with HPRT expression. All samples were run in duplicate. F) Immunohistochemistry stainings of VE-cadherin, occludin and ZO-1 on brain sections of MHV3-, MHV-A59- and 51.6-MHV3-infected mice. (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001)

### 3.3.4.3- BMECs (bEnd.3 cell line) are higher permissive to MHV3 than 51.6-MHV3 and MHV-A59 replication

Decrease in tight junction protein expression may result from direct permissivity of BMECs to viral replication and subsequent virus-induced cell damages (Gralinski *et al.*, 2009). To determine whether specific MHV3-induced breakdown of the BBB and alteration of tight junction expression resulted from a differential permissivity of BMECs to MHV infections, *in vitro* infections with 0.1 m.o.i. of MHV3, 51.6-MHV3 and MHV-A59 were conducted on a BMEC cell line (bEnd.3 cells), known to express similar properties as primary BMECs (Brown *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2013). The kinetics of viral replication showed that production of infectious MHV3 increased from day 2 to day 3 p.i. and then stabilized up to day 8 p.i. (Fig. 9A). Viral titers of MHV-A59, unlike MHV3 infection, steadily decreased over time after a rapid increase in the first 3 days ( $p \leq 0.01$ ). As expected, the 51.6-MHV3 variant, expressing low tropism for liver endothelial cells (Martin *et al.*, 1994), showed a delayed replication in bEnd.3 cells, as evidenced by absence of infectious virus production until day 3 p.i. followed by a lower viral replication level ( $p \leq 0.01$ ). Occurrence of few foci of cytopathic effects, characterized by rounded cells instead of typical “cobblestone” morphology, were noted in MHV3- and MHV-A59-infected cell cultures, but no typical MHV-induced giant syncytial cells nor cell lysis were observed (not shown).

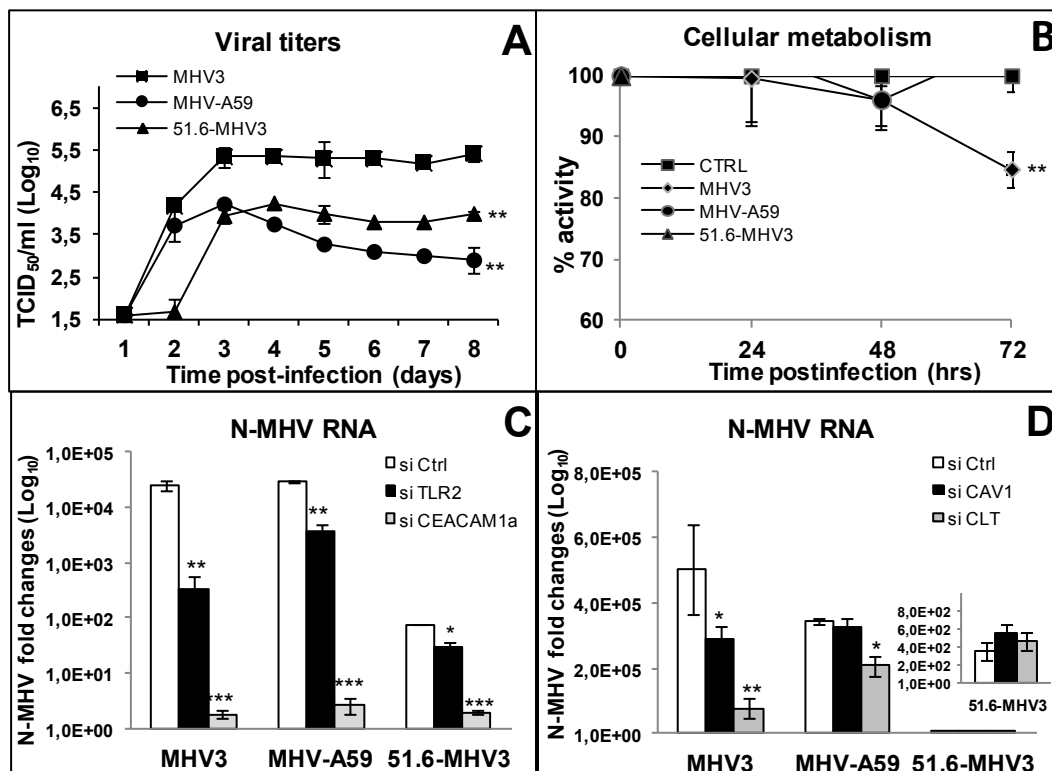
In order to confirm low or no major changes in cell viability within the first 72h of infection in MHV3, MHV-A59 or 51.6-MHV3-infected BMECs, metabolic activity of infected bEnd.3 cells was evaluated using the MTS/PMS colorimetric assay from 24h to 72h p.i. and compared to uninfected control cells. Percentage of O.D., when compared with control cells, slowly decreased (about 15%) in the first 72 h. p.i. only in MHV3-infected bEnd.3 cells ( $p \leq 0.01$ ) (Fig. 9B). In addition, the loss of cell activity did not increase when cells were infected with a higher M.O.I (1 and 5 M.O.I.) (results not shown).

#### **3.3.4.4- Higher permissivity of BMECs to MHV3 depends on CEACAM1a and TLR2 ligation, and both clathrin- and caveolin-dependent endocytosis for entry in contrast to 51.6-MHV3 and MHV-A59**

It was previously shown that protective role of BBB against brain invasion by blood-borne MHV-A59 was related to a specific blockade of viral entry in BMECs (Godfraind *et al.*, 1997). Fixation and entry of MHVs in target cells generally depend on fixation of viral S protein to the common MHV receptor CEACAM1a and further endocytosis or fusion with host cell (Belouzard *et al.*, 2012). However, we have also previously demonstrated that S protein from MHV3 can ligate to TLR2 on macrophage cell surface (Jacques *et al.*, 2009b). To provide insight into how MHV3 exhibit differential viral fixation and/or entry into BMECs in comparison to MHV-A59 and 51.6-MHV3, levels of MHV nucleoprotein (N) RNA, as indicator of viral entry and/or subsequent replication, were evaluated in bEnd.3 cells following abrogation of CEACAM1a or TLR2 expression by specific siRNAs. As shown in figure 9C, abrogation of the CEACAM1a expression resulted in a substantial decrease of MHV-N RNA expression in BMECs infected with all viruses ( $p \leq 0.001$ ). Knockdown of TLR2 expression, however, provoked a higher decrease of viral replication in MHV3-infected cells ( $p \leq 0.01$ ) than in MHV-A59 and 51.6-MHV3 infected cells ( $p \leq 0.01$  and  $0.05$ , respectively) suggesting a more important role for TLR2 in the fixation or entry of MHV3 in BMECs.

It has been already demonstrated that restriction of BBB to low hepatotropic MHV-A59 virus entry is abrogated by SDS detergent treatment (Godfraind *et al.*, 1997), suggesting that restriction of MHV-A59 entry in BMECs occurs at the endocytosis step (Fine *et al.*, 2011). It is thus proposed that MHV3, in contrast to MHV-A59, take advantage of caveolin- and/or clathrin-dependent endocytic pathways to infect BMECs. To address this, bEnd.3 cells were treated with siRNAs for clathrin or caveolin-1 prior to infection by all MHV strains. As shown in figure 9D, N-MHV RNA levels decreased in MHV3-infected cells when clathrin or caveolin-1 expression was abrogated ( $p \leq 0.05$  to  $0.01$ ) while N-MHV RNA levels of MHV-A59 were altered only in clathrin-deficient infected cells ( $p \leq 0.05$ ), suggesting that MHV3, in contrast to MHV-A59, may use both endocytic pathways for viral entry into BMECs. No

significant effect was observed in 51.6-MHV3-infected cells, due to no or low viral RNA level.



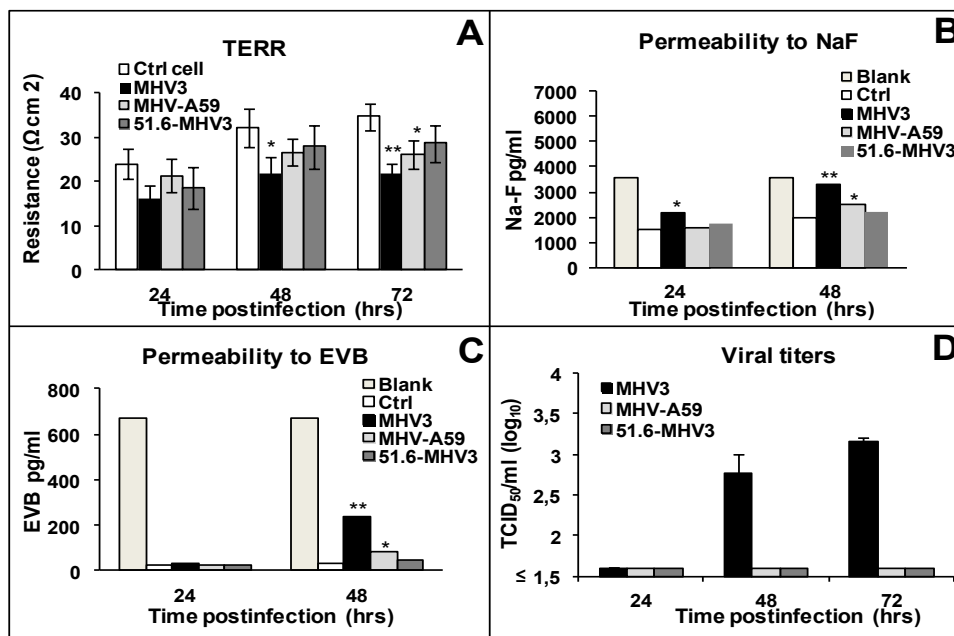
**Figure 30. MHV3 exhibits higher tropism for BMECs than MHV-A59 and 51.6-MHV3.** Mouse bEnd.3 immortalized brain microvascular endothelial cells (BMECs) were infected with MHV3, MHV-A59 or 51.6-MHV3 at M.O.I of 0.1 A) Kinetics of MHV infections up to 8 days p.i. B) Metabolic activity of infected BMECs as determined by MTS-PMS colorimetric assay from 24 h to 72 h p.i. C) Role of CEACAM1a and TLR2 in MHV entry into BMECs, and D) Role of caveolin (CAV-1) and clathrin (CLT) in MHV endocytosis by BMECs. bEnd.3 cells were treated with specific siRNA to each molecule prior to infection for 24h and MHV nucleoprotein (N) mRNA expression was determined by qRT-PCR. All experiments were conducted in triplicate. Results are representative of two or three independent experiments. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ )

### 3.3.4.5- MHV3, but not MHV-A59 and 51.6-MHV3, enhances *in vitro* permeability of BMECs leading to viral transendothelial migration

We further investigated whether MHV3 infection might affect *in vitro* the barrier functions of BMECs, such as observed *in vivo*. To address this, an *in vitro* model of BBB was constructed

using bEnd.3 cell monolayers growing on transwell inserts as previously described (Watanabe *et al.*, 2013; Brown *et al.*, 2007). Firstly, cells were infected with MHV strains for 24 to 72h and transendothelial electrical resistance (TEER), reflecting BBB integrity, was monitored. TEER decreased at 48 and 72 h p.i. in MHV3-infected BMECs ( $p \leq 0.05$  to 0.01) while it was weakly affected at 72h p.i. only in MHV-A59-infected cells ( $p \leq 0.05$ )(Fig. 10A). The 51.6-MHV3 infection did not alter the TEER.

Thereafter, to determine whether such alteration of TEER in MHV3-infected bEnd3 cells correlated with enhanced paracellular permeability, extravasation of the fluorescent NaF dye through infected bEnd.3 monolayers was evaluated in the basolateral chamber. NaF uptake was significantly increased in MHV3-infected monolayers as soon as 24h p.i. and extended to 48h p.i, indicating considerable effects on BBB paracellular permeability ( $p \leq 0.05$  to 0.01) (Fig.10B). MHV-A59 infection, however, induced a slight increase of NaF uptake at 48h p.i. only ( $p \leq 0.05$ ). To further characterize the extent of damage induced by MHV3 infection on BMEC permeability, extravasation of the high molecular weight Evans Blue dye (EVB) was assessed. Albeit to a lesser extent than NaF, a higher uptake of EVB was found in MHV3 ( $p \leq 0.01$ ) when compared to MHV-A59-infected bEnd.3 monolayers ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 10C). No effect on the permeability to either dye was noted in 51.6-MHV3-infected cells. Finally, we postulated that MHV3-induced enhancement of permeability would allow the virus to transmigrate across the bEnd.3 monolayer, so we assessed infectious virus titers in the basolateral chamber. As shown in figure 10D, MHV3 (over than 1.6 log<sub>10</sub>) but not MHV-A59 or 51.6-MHV3 viral titers were detected at 48 and 72h p.i. in the basolateral chamber indicating that only MHV3 exhibited ability to cross the *in vitro* BMEC barrier.



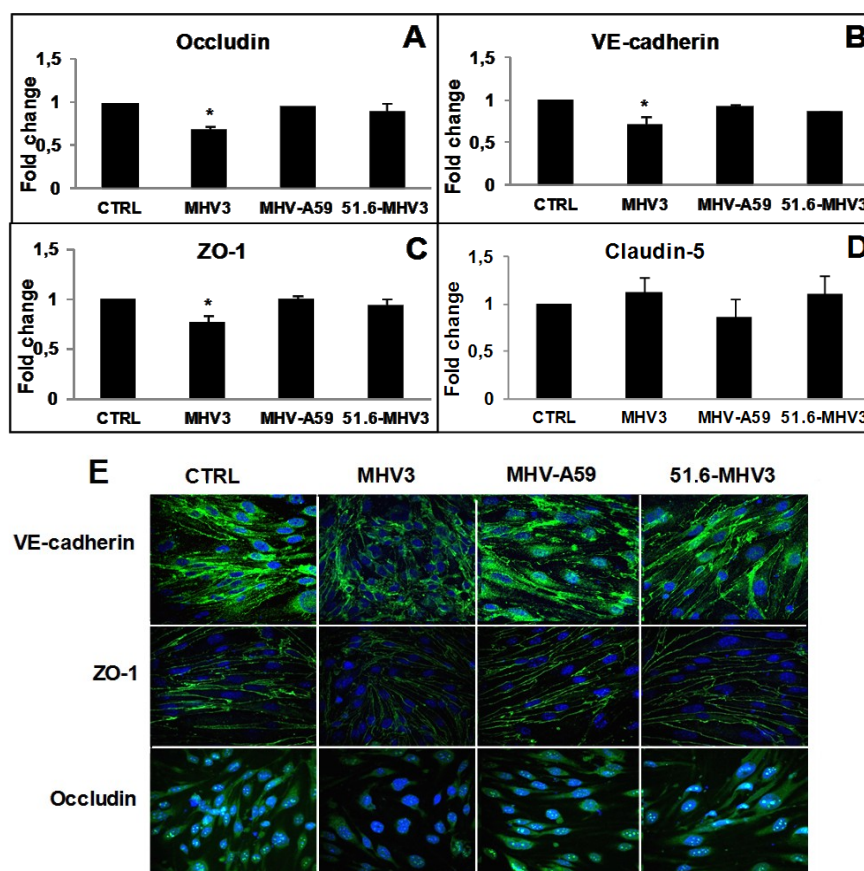
**Figure 31. MHV3, but not MHV-A59 and 51.6-MHV3, alters *in vitro* BMEC barrier integrity.** An *in vitro* model of BBB was constructed using bEnd.3 cell monolayers grown on transwell inserts and cells were infected with MHV3, MHV-A59 or 51.6-MHV3 at M.O.I of 0.1. A) Transendothelial electrical resistance (TEER), reflecting barrier integrity, was monitored from 24 to 72 h. B-C) Evaluation of the paracellular permeability of bEnd.3 monolayers to NaF (B) or Evans blue (C) dye at 24 and 48 h p.i. Blank corresponds to maximal permeability (insert without cells) D) Determination of viral transmigration across the bEnd.3 monolayer. Viral titers were recorded in the basolateral chamber from 24 to 72 h p.i. Viral detection threshold is 1.6 TCID<sub>50</sub>. All experiments were conducted in triplicate. Results are representative of two independent experiments. (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01)

### 3.3.4.6- Breakdown of the *in vitro* BMEC barrier by MHV3 results from decreased expression of occludin, VE-cadherin and ZO-1 tight junction proteins

To further determine whether MHV3-induced impairment of barrier function of BMECs was associated with alteration of tight junctions in BMECs, such as observed above in the brain of infected mice, mRNA expression levels of claudin-5, ZO-1, VE-cadherin and occludin were evaluated in infected bEnd.3 cells by qRT-PCR at 48h p.i. Significant reduction of ZO-1, occludin and VE-cadherin mRNA expression occurred in MHV3-infected BMECs only ( $p \leq 0.05$ ) (Figs 11A, B and C). Claudin-5 mRNA expression in BMECs, however, was not affected by MHV3 neither other virus strains (Fig. 11D).



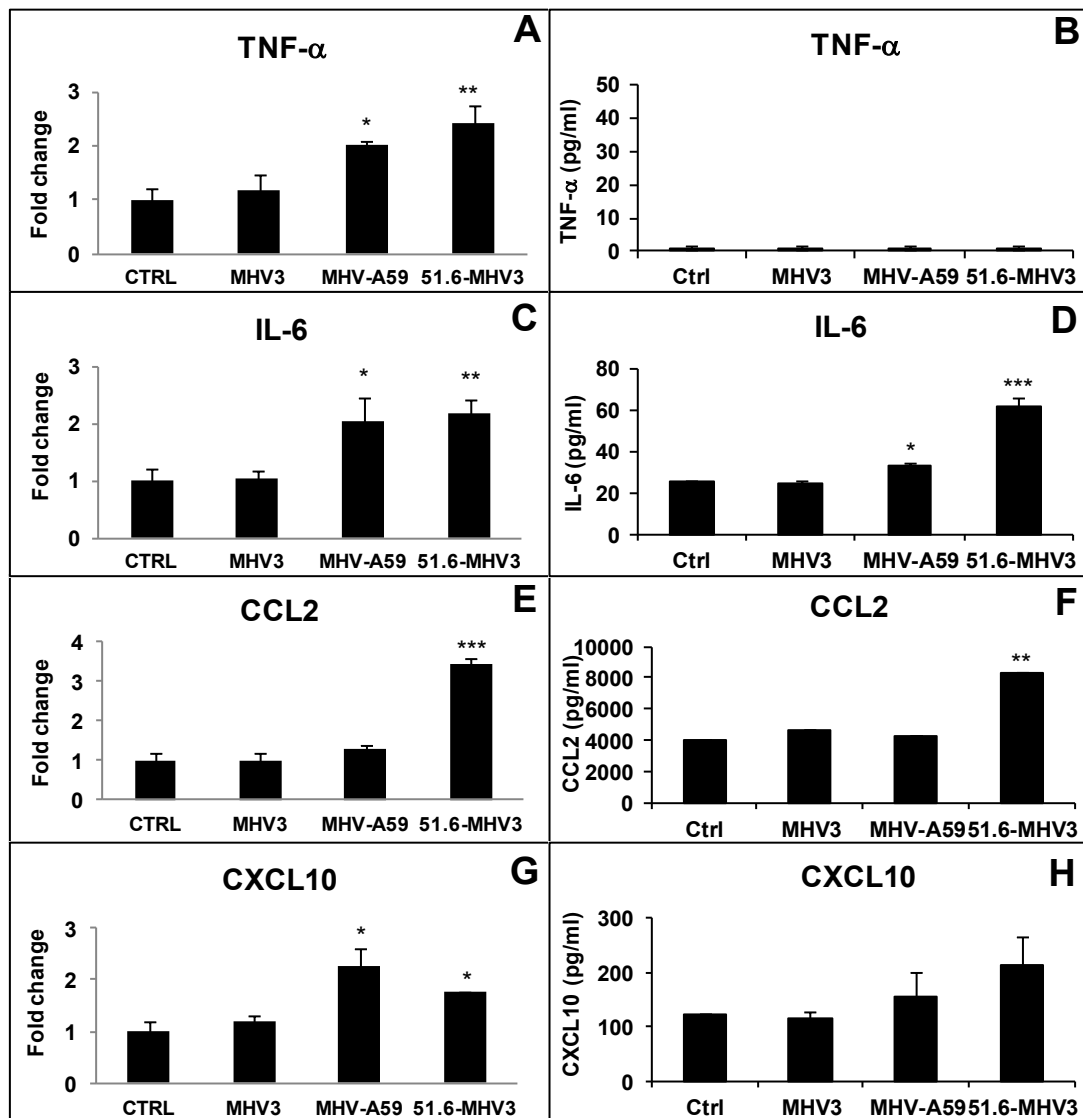
To confirm that such reduction in mRNA expression of tight junction was consistent with a reduction in protein expression, immunofluorescence stainings were performed on infected cells. In comparison to uninfected cells (control), intensity of surface staining of VE-cadherin and ZO-1 as well as cytoplasmic and nuclear stainings of occludin decreased in MHV3-infected BMECs while no apparent difference was noted in neither MHV-A59- nor 51.6-MHV3-infected cells (Fig. 11E).



**Figure 32. MHV3, but not MHV-A59 and 51.6-MHV3, alters tight junction expression on BMECs.** bEnd.3 cells were infected for 48h with MHV3, MHV-A59 and 51.6-MHV3 at M.O.I of 0.1 and mRNA expression levels of occludin (A), VE-cadherin (B), ZO-1 (C) and claudin-5 (D) were evaluated by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to uninfected cells (CTRL) after normalization with HPRT expression. All samples were run in duplicate. All experiments were conducted in triplicate. Results are representative of two independent experiments. E) Immunofluorescence stainings of the tight junctions (green) VE-cadherin, occludin, ZO-1 and the nucleus (blue) on uninfected (CTRL) and infected bEnd.3 cells. Images presented are from one representative experiment out of 3 independent experiments. (\*P < 0.05)

### 3.3.4.7- MHV3-induced breakdown of the in vitro BMEC barrier does not depend on inflammatory factors

BBB disruption during viral infection may be indirectly provoked by viral-induced inflammatory mediators, such as the cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6 or chemokines CCL2 and CXCL10 (Spindler & Hsu, 2012; Wang *et al.*, 2004; Afonso *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2014; Chai *et al.*, 2015). Accordingly, we hypothesized that MHV3 but not MHV-A59 and 51.6-MHV3 infections may increase the production of autocrine inflammatory factors by BMECs that might subsequently compromised BBB integrity. To address this, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, CCL2, and CXCL10 were evaluated in MHV-infected bEnd.3 cells by qRT-PCR and ELISA tests at 24h p.i. As shown in figures 12A and B, mRNA levels of TNF- $\alpha$  did not increase in MHV3-infected cells in contrast to 51.6-MHV3- and MHV-A59-infected cells ( $p \leq 0.05$ ) although protein expression was not detected by ELISA test. Transcription and production of IL-6, however, increased in 51.6-MHV3 and MHV-A59-infected cells ( $p \leq 0.05$  to 0.001) (Figs 12C and D) but not MHV3-infected cells. The production of CCL2 increased only in 51.6-MHV3-infected cells ( $p \leq 0.01$  to 0.001) (Figs 12E and F) while CXCL-10 levels were not induced in any MHV-infected cells (Figs 12G and H). Taken together, these results suggest that barrier breakdown by MHV3 infection does not correlate with induction of inflammatory factors which are rather produced by 51.6-MHV3- and MHV-A59-infected cells.



**Figure 33. MHV3-induced breakdown of BMEC barrier does not depend on inflammatory factors.** bEnd.3 cells were infected with MHV3, MHV-A59 and 51.6-MHV3 at M.O.I of 0.1 and mRNA expression (A-C-E-G) and protein levels (B-D-F-H) of TNF- $\alpha$ , IL-6, CCL2 and CXCL10 were evaluated by qRT-PCR and ELISA tests respectively at 24h p.i. All samples were run in duplicate. All experiments were conducted in triplicate. Results are representative of two independent experiments. (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001)

### 3.3.4.8- MHV3-induced breakdown of in vitro BMEC barrier is related with impaired production of IFN- $\beta$ by infected cells

It was demonstrated that IFN- $\beta$  promotes BBB integrity and prevent virus-induced barrier breakdown (Daniels *et al.*, 2014; Kraus *et al.*, 2004). Accordingly, we hypothesized that MHV-A59 or 51.6-MHV3, but not MHV3, induced barrier protective IFN- $\beta$  production by BMECs. As expected, higher levels of mRNA and secreted IFN- $\beta$  were detected in 51.6-MHV3 and MHV-A59-infected cells ( $p \leq 0.05$  to 0.001) in comparison to MHV3-infected cells ( $p \leq 0.05$ ) (Figs 13A and B).

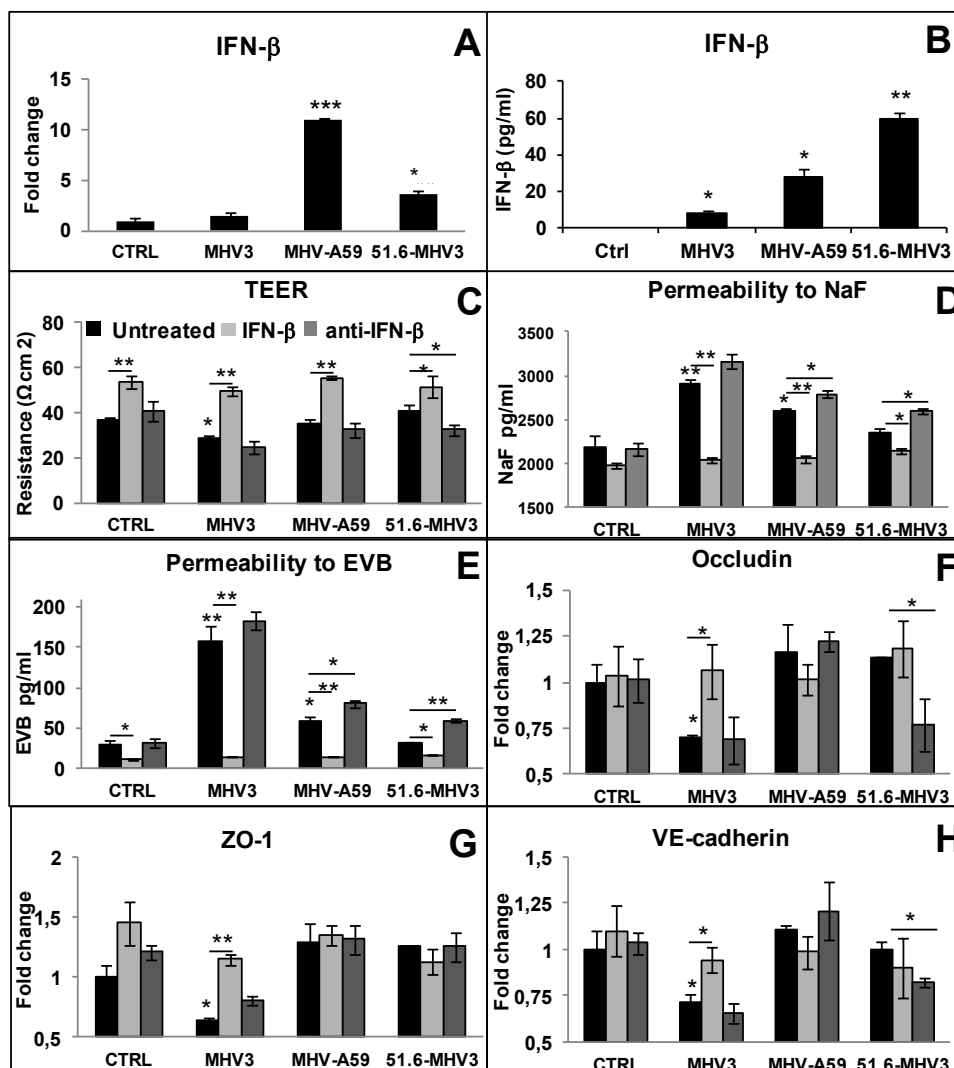
To confirm that barrier disruption during MHV3 infection results from absence of IFN- $\beta$  production, we evaluated the barrier properties of bEnd.3 monolayers upon MHV infections in presence of IFN- $\beta$  (100 pg/ml) or anti-IFN- $\beta$  antibodies (1 ug/ml) respectively at 48 h p.i. As observed in Fig.7C, addition of IFN- $\beta$  increased the TEER both in control (uninfected) and MHV-infected cultures which is in concordance with its barrier enhancing properties ( $p \leq 0.05$  to 0.01). TEER decreased only in MHV3-infected cells but was completely restored by IFN- $\beta$  treatment ( $p \leq 0.01$ ) (Fig.13C). However, addition of anti-IFN- $\beta$  antibodies did not decrease TEER in spite of a nonsignificant decrease in 51.6-MHV3-infected cells. Moreover, previously observed enhancement of paracellular permeability to NaF and EVB in MHV3-infected cells and at a lesser extent in MHV-A59-infected cells at 72 h p.i. was abolished following addition of IFN- $\beta$  ( $p \leq 0.01$  and 0.05) (Figs 13D and E) while anti-IFN- $\beta$  treatment increased paracellular permeability in low hepatotropic MHV-A59 and 51.6-MHV3-infected BMECs when compared with untreated infected cells ( $p \leq 0.01$  and 0.05).

In order to confirm that rescued barrier properties of infected bEnd.3 cells following IFN- $\beta$  treatment results from preservation of tight junction protein expression, mRNA expression levels of occludin, ZO-1 and VE-cadherin were analyzed by qRT-PCR. As shown in figures 13-F to H, addition of IFN- $\beta$  on MHV3-infected cells abolished the decreases of occludin, ZO-1 and VE-cadherin gene expression ( $p \leq 0.05$  to 0.01) and blocked MHV3 trafficking

across the bEnd.3 monolayer, as no infectious viruses were detected in the basolateral chamber (not shown).

On the other hand, neutralization of IFN- $\beta$  potentially produced in MHV3-infected culture did not worsen viral-induced barrier permeability nor reduction of tight junctions (Figs 13D to H), which is in accordance with low levels of IFN- $\beta$  produced by MHV3-infected cells. However, as shown in MHV-A59- and 51.6-MHV3-infected cultures, neutralization of IFN- $\beta$  increased barrier permeability to NaF and EVB ( $p \leq 0.05$  to  $0.01$ ) correlating with concomitant reduction of TEER ( $p \leq 0.05$ ) (Figs 7C to E) and decreased expression of occludin and VE-cadherin in 51.6-MHV3- but not MHV-A59-infected cells ( $p \leq 0.05$ ) (Figs 7F to H).

To verify whether such improvement of barrier integrity by IFN- $\beta$  might indirectly result from its antiviral rather than its barrier protective properties, virus titers were assessed in both IFN- $\beta$ -treated and untreated MHV-infected cells. Viral replication of MHV3 was not blocked by IFN- $\beta$  treatment since viral titers remained similar in untreated and IFN- $\beta$ -treated infected cells ( $4.6 \pm 0.3$  and  $4.3 \pm 0.3$   $\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$  respectively) while MHV-A59 replication was completely abolished in IFN- $\beta$ -treated cells (from  $3.9 \pm 0.33$  to  $<1.6$   $\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ). Moreover, neutralization of IFN- $\beta$  increased viral titers in MHV-A59- and 51.6-MHV3-infected cells (from  $3.9 \pm 0.33$  to  $5 \pm 0.04$   $\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$  and from  $<1.6$  to  $4 \pm 0.1$   $\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$  respectively). In addition, neutralization of IFN- $\beta$  allowed transit of MHV-A59 but not 51.6-MHV3 across the cell monolayer as evidenced by titers in the basolateral chamber ( $3.175 \pm 0.25$   $\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ). These results suggest that amounts of IFN- $\beta$  produced by BMECs upon infection with MHV-A59 and 51.6-MHV3, but not MHV3, may both control viral replication in these cells and prevent induction of BBB breakdown.



**Figure 34. MHV3-induced breakdown of BMEC barrier is related to downregulation of barrier protective IFN- $\beta$  production by infected BMECs.** A-B) bEnd.3 cells were infected with MHV3, MHV-A59 and 51.6-MHV3 at M.O.I of 0.1 and mRNA (A) and protein expression (B) of IFN- $\beta$  was evaluated at 24h p.i. by qRT-PCR and ELISA tests respectively. All samples were run in duplicate. All experiments were conducted in triplicate. C-H) Evaluation of barrier integrity of bEnd.3 monolayers infected 48 h with MHV3, MHV-A59 and 51.6-MHV3 at M.O.I of 0.1 in presence of recombinant IFN- $\beta$  (100 pg/ml) or anti-IFN- $\beta$  monoclonal antibodies (1  $\mu$ g/ml). C) Recordings of TEER in infected bEnd.3 cultures. D-E) Evaluation of the paracellular permeability of infected bEnd.3 monolayers to NaF (D) or Evans blue (E) dyes. F-H) mRNA expression levels of occludin, ZO-1 and VE-cadherin in bEnd.3 cells evaluated by qRT-PCR. Values represent fold change in gene expression relative to uninfected cells (CTRL) after normalization with HPRT expression. Results are representative of two independent experiments. (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001)

### 3.3.5- Discussion

In this work, we report for the first time that BBB integrity can be impaired during acute liver infection by high hepatotropic MHV3, but not low hepatotropic MHV-59 and 51.6-MHV3 strains, enabling MHV3 invasion of CNS. We demonstrated here that MHV strain-specific ability to cross the BBB during acute liver infection correlated with enhanced BBB permeability as evidenced *in vivo* and *in vitro*. Enhanced BBB permeability in MHV3 infection only, is associated with higher viral tropism for BMECs and disruption of ZO-1, VE-cadherin and occludin tight junctions. Such impairment of tight junction expression was independent of viral-induced barrier-dysregulating TNF- $\alpha$ , IL-6, CCL2 and CXCL-10 but rather related to inhibition of barrier protective IFN- $\beta$  production by BMECs.

Some human respiratory strains of CoVs have shown neuroinvasive properties and were proposed as potential etiological agents for multiple sclerosis (Arbour *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 1992; Stewart *et al.*, 1992) but their mechanism of neuroinvasion is unclear. The major aim of our work was to investigate the ability of CoVs to enter the CNS through the BBB during the acute phase of infection in peripheral organs. We provide evidence that brain invasion by blood-borne MHVs correlate with strain virulence and peripheral replication in the liver. As previous studies reported the inability of the low hepatotropic MHV-A59 strain to induce neurological disease following i.p. infection in contrast to the high hepatotropic MHV3 (Tardieu *et al.*, 1982; Gordfraind *et al.*, 1997), we presumed a strain-specific restriction of CNS invasion at the BBB level according to virulence. In agreement, brain examination of i.p. acutely infected mice revealed that viral replication occurred only in the brain of MHV3-infected mice indicating specific ability of this strain to enter the CNS by hematogenous route. Moreover, no replication in the brain of the 51.6-MHV3 variant, having no tropism for endothelial cells (Martin *et al.*, 1994), suggested that permissivity of cerebral endothelial cells to MHV3 infection played a major role in brain invasion. This strain-specific ability of MHV3 to cross the BBB *in vivo* has been confirmed *in vitro* on a modeled BBB of bEnd.3 cell monolayer grown on a transwell system. As expected, only MHV3 virus transmigrated across the bEnd-3 monolayer and reached the basolateral chamber. BBB invasion by MHV3 during

acute infection results from enhanced barrier permeability as evidenced by a higher decrease of TEER and leakage of both the low molecular weight NaF and the high molecular weight Evan's blue dyes in the brain of infected mice and/or BMECs. We would reasonably assume that viral-induced BBB impairment preceded viral brain invasion *in vivo* since no virus titers were found until 72 h p.i. in the brain while infectious viruses were detected as soon as 24 h p.i. in the liver of MHV3-infected mice (results not shown). Thus, high primary replication of MHV3 in the liver may predispose secondarily to hematogenous spread of viruses to the CNS. Taken together, these results demonstrate the strain-specific ability of the highly hepatotropic MHV3 to cross the BBB but not the attenuated 51.6-MHV3 or low hepatotropic MHV-A59.

BBB disruption by blood-borne viruses after primary replication in peripheral organs is a common feature of several acute viral infections but mechanisms involved are not completely elucidated. Several of them, including the murine adenovirus (MAV)-1, human deficiency virus (HIV)-1, West Nil virus (WNV) and lymphocytic choriomeningitidis mouse virus (LCMV) infections were reported to trigger increase of BBB permeability through disruption of tight junctions (Spindler & Hsu, 2012; Gralinski *et al.*, 2009; Daniels *et al.*, 2014). We showed here for the first time, that a member of coronaviruses, the MHV3 can increase BBB permeability in impairing tight junctions ZO-1, VE-cadherin and occludin expression in BMECs and the brain. MHV-A59 or 51.6-MHV3 strains, however, induced no or a slight reduction of ZO-1 and VE-cadherin expression that may reflect their weak tropism for BMECs. No decrease of claudin-5 expression was observed suggesting that either claudin was not specifically altered by viral infection or low decrease of claudin-5 might be masked by the higher number of other claudin family members (Mineta *et al.*, 2011).

Viral replication and/or viral products are rarely directly implicated in BBB disruption (Spindler & Hsu, 2012) but MAV-1 infection itself and the gp120 from HIV were shown to disrupt tight junctions on BMECs (Gralinski *et al.*, 2009; Nakamuta *et al.*, 2008). Replication of MHV3 in BMECs did not reach high titers and was associated with low cell damages and loss of activity. As expected, ligation to CEACAM1a viral receptor was essential for infection of BMECs by all MHVs but MHV3 exhibited an additional ability to take advantage of both caveolin- and clathrin-dependent endocytic pathways for entry into BMECs. MHV-A59 entry



via clathrin- but not caveolin-dependent endocytosis has also been previously reported in other cell types (Burkard *et al.*, 2014; Eifart *et al.*, 2007). TLR2 is located in enriched caveolin-1 associated lipid rafts microdomains at cell surface (Soong *et al.*, 2004). We have shown that TLR2 engagement by MHV3 on BMECs favored viral replication which is in agreement with our previous findings that viral S protein of MHV3 can ligate to both CEACAM1a and TLR2 on macrophages (Jacques *et al.*, 2009b), in contrast to MHV-A59 (Zhou *et al.*, 2010). Interestingly, as TLR2 activation was shown to increase permeability and downregulate tight junction protein expression on BMECs (Nagyoszi *et al.*, 2010), TLR2 ligation by viruses or soluble viral coat proteins may represent a new mechanism of BBB disruption by viruses.

Viral fixation and endocytosis pathways also trigger activation of inflammatory cytokines, chemokines and interferon type 1 according to TLR and/or helicase-dependent downstream signalling pathways (Wang *et al.*, 2004; Jacques *et al.*, 2009b; Daniels *et al.*, 2014). Loss of tight junctions in several viral infections can indirectly result from viral-induced barrier-dysregulating cytokines or chimiokines such as IL-6, TNF- $\alpha$ , CCL2 or CXCL10 by BMECs themselves or other CNS cell types (Spindler & Hsu, 2012; Wang *et al.*, 2004; Afonso *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2014; Chai *et al.*, 2015). It was previously shown that MHV3 fixation to TLR2 in macrophages increased TNF- $\alpha$  and IL-6 production (Jacques *et al.*, 2009b) but herein, no induction of cytokine and chemokine production by MHV3-infected BMECs were observed. However, cytokine and chemokine productions were rather noted in BMECs infected with 51.6-MHV3 and MHV-A59 indicating that BBB breakdown can not result from viral-induced host inflammatory factors since BBB was not significantly altered by these latter strains. Nevertheless, we cannot exclude that cytokines and chemokines may be produced *in vivo* by recruited inflammatory cells in the CNS during MHV3 infection and thus contribute to BBB disruption. However, only few inflammatory cells have been evidenced by HES staining at 72h p.i. in the brain of MHV3-infected mice and levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , CCL2 and CXCL10 were lower in the brain of MHV3-infected mice in comparison to MHV-A59- and 51.6-MHV3-infected mice (results not shown), thus minimizing the role of inflammatory factors in BBB breakdown.

Postinfection BBB breakdown has already been observed following intracerebral infection of mice with the strict neurotropic MHV-JHM strain and has been primarily associated with matrix-metalloproteinases (MMP)-9 produced by infiltrating neutrophils (Zhou *et al.*, 2003). However, in this study, *in vivo* enhancement of BBB permeability was only observed by day 4 p.i. Such discrepancies with our data may result from differences in the route of inoculation and the MHV strain used. It is possible that intracerebral inoculation, which is bypassing BBB transit, may have not conducted to infection of the endothelium by the virus. Herein, we report that MHV3 infection of BMECs can directly alter BBB integrity without assistance of neutrophils and MMPs. We cannot, however, rule out the possibility that later recruited neutrophils may further affect BBB integrity by MMP production once it has been firstly compromised by viral infection of BMECs. Preliminary data, however, revealed that expression of MMP1a and MMP3 by BMECs was not affected by *in vitro* infection with MHV3, 51.6-MHV3 nor MHV-A59 strains (results not shown).

Unlike inflammatory mediators, IFN- $\beta$  is rather known to promote tight junction formation and stability (Kraus *et al.*, 2004). The differential IFN- $\beta$  production by BMECs upon infection by MHVs may possibly represent one key factor in MHV strain specificity to induce BBB breakdown. We have shown that 51.6-MHV3 and, to a lesser extent MHV-A59, in comparison to MHV3, elicited IFN- $\beta$  production by BMECs supporting the hypothesis that IFN- $\beta$  could act as a protective factor in preventing barrier damages and brain invasion by these strains. The lower IFN- $\beta$  production by cells infected with MHV-A59 may reflect posttranscriptional inhibitory mechanisms of IFN- $\beta$  production by viral factors (reviewed in Rose & Weiss, 2009). Induction of IFN- $\beta$  by WNV has already been reported to prevent its trafficking across a BBB model *in vitro* (Daniels *et al.*, 2014). The specific mechanism of barrier protection by IFN- $\beta$  is unknown but Daniels *et al.* (2014) recently reported that IFN- $\beta$  was able to rescue barrier dysfunction elicited by inflammatory cytokines. Thus, one could speculate that IFN- $\beta$  production by MHV-A59- and 51.6-MHV3-infected BMECs may counteract cytokine-mediated barrier damages or low levels of inflammatory cytokines produced by infected BMEC cells may not be sufficient to induce BBB breakdown. In accordance, activation of type I IFNs by dengue virus was reported to ameliorate inflammatory cytokine-driven barrier

dysfunction in peripheral endothelium (Patkar *et al.*, 2013). Importance of IFN- $\beta$  downregulation in MHV3-induced BBB breakdown is supported by our results showing that addition of IFN- $\beta$  antagonized MHV3-mediated permeability and disruption of tight junctions in BMECs independently of its antiviral properties, as viral replication was not altered. Resistance of MHV3 to antiviral properties of type I IFN *in vitro* has already been observed (Vassão *et al.*, 1994). On the other hand, barrier integrity in MHV-A59 and 51.6-MHV3-infected BMEC monolayers was lost when IFN- $\beta$  was neutralized with mAb antibodies, confirming that prevention of BBB breakdown during MHV-A59 and 51.6-MHV3 infection is due, at least, to IFN- $\beta$  production. Moreover, in contrast to MHV3, replication of MHV-A59 and 51.6-MHV3 was lowered by IFN- $\beta$  suggesting that BMECs can control replication of these viral strains through IFN- $\beta$  production. This is in agreement with previous findings showing no appearance of productive replication of MHV-A59 in BMECs *in vivo* (Godfraind *et al.*, 1997; Lavi *et al.*, 1999).

Hence, the results of this study report for the first time that hematogenous spread mouse coronaviruses can invade the CNS at the BBB level following peripheral primary replication. Following intraperitoneally (i.p.) infection, the MHV3 serotype induces acute lethal fulminant hepatitis in C57BL/6 mice within 4 days postinfection (p.i.) (Le Prévost *et al.*, 1975) whereas the low hepatotropic MHV-A59 is cleared early in the liver, presumably through to a rapid control of viral replication by macrophages (Wijburg *et al.*, 1997; Cervantes-Barragan *et al.* 2009). Thus, sooner and higher replication of MHV3 in the liver (not shown) combined to higher permissivity of BMECs to MHV3 infection may potentiate BBB breakdown and dissemination of viruses into the CNS. Interestingly, advanced stages of viral or non-viral-induced acute liver failure (fulminant hepatitis) in humans are often associated with lethal cerebral oedema as a consequence of BBB breakdown and alterations in the tight junctions (Nguyen 2013; Wei *et al.* 2013). On the other hand, preservation of BBB integrity and lower hepatic viral load in MHV-A59 and 51.6-MHV3 infections prevent their traffick from the periphery to the CNS. This hypothesis is supported by previous report showing that MHV-A59 spread to the brain is only allowed after i.v injection of sodium dodecylsulfate detergent to the mice, which is presumed to alter BBB integrity (Godfraind *et al.*, 1997).

In human infections, mechanism involved in CNS invasion by CoVs following primary infection in the upper respiratory tract is unclear. The CoV 229E strain was previously reported to infect BMECs (Cabirac *et al.*, 1995), suggesting that BBB invasion by human CoVs is probable.

The mechanism(s) used by MHV3 to block the production of IFN- $\beta$  by BMECs is pending. The absence of cytokine and chemokine production by MHV3-infected BMECs, in contrast to MHV-A59 and 51.6-MHV3, suggests that MHV3 may specifically evade detection by TLRs or helicases and/or signalling downstream pathways in BMECs. Accordingly, Mazaleuskaya *et al.* (2012) have recently shown that stimulation of TLR-2, TLR-4 and TLR-7 by specific agonists had no effect on MHV3 replication. Further research is needed to confirm viral evasion mechanisms used by MHV3 in BMECs and their consequence in BBB disruption.

### **3.3.6- Acknowledgements**

The authors want to acknowledge Dominic Fillion and Pascale Bellaud for their technical assistance with confocal microscopy and histochemistry respectively, and Dr. Antony Karelis for revision of the manuscript. This work was granted by NSERC, Government of Canada and Christian Bleau was supported by NSERC fellowship.

NB. Les références citées dans cet article ont été incluses dans la section bibliographie de la thèse.

## **4- DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Les cellules endothéliales (EC), par leur position anatomique et leur capacité de défense innée antivirale constituent une première barrière importante à la dissémination systémique de virus pléiotropiques par voie hématogène. Des dysfonctions au niveau des EC de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et des sinusoides hépatiques ont été rapportées lors de neuropathologies et d'hépatites aiguës ou chroniques d'origine virale (Guzmán-Fulgencio *et al.*, 2011; Spindler & Hsu, 2012) suggérant que des atteintes à leur intégrité dans la phase aiguë de l'infection pourraient favoriser une aggravation du processus pathogénique. L'objectif principal de cette thèse visait à identifier les mécanismes impliqués dans les déficits précoces des EC des microvaisseaux cérébraux (BMEC) et des sinusoides hépatiques (LSEC) lors d'infections virales aiguës, en relation avec leurs rôles dans les réponses antivirales et leurs fonctions inflammatoires ou de tolérance, et leur conséquence sur l'évolution de l'infection. À l'aide de différents sérotypes et variants MHV, sélectionnés pour leur capacité à induire des hépatites et des maladies neurologiques et leurs différents niveaux de pathogénicité et/ou de tropisme pour les EC, nous avons démontré que l'infection productive des EC cérébrales et hépatiques se traduit par des anomalies fonctionnelles et structurales qui favorisent l'invasion virale intracérébrale et aggravent la sévérité de l'hépatite. Plus précisément, nous avons démontré que l'infection primaire du foie et des LSEC par le sérotype fortement virulent MHV3 provoque un bris de la tolérance hépatique et un dérèglement dans le recrutement intrahépatique des cellules inflammatoires qui favorisent la réplication virale et exacerbent la réponse inflammatoire et les dommages hépatiques. Ces dysfonctions sont en partie reliées à la fixation du MHV3 au TLR2 présent à la surface des cellules hépatiques, dont les LSEC, révélant un nouveau rôle pour le TLR2 dans l'aggravation de la réponse inflammatoire et de la sévérité de l'hépatite virale aiguë.

Nous avons également démontré que la forte réplication virale et les dysfonctions induites par le MHV3 dans le foie, par rapport au sérotype moins virulent MHV-A59 et au variant atténué 51.6-MHV3, corrélaient aussi avec l'invasion virale du SNC. Cette invasion était associée avec l'induction spécifique par le virus MHV3 d'un bris de la BHE résultant d'une altération des protéines de jonctions sur les BMEC entraînant ainsi une augmentation de la perméabilité de la BHE et l'entrée subséquente du virus dans le SNC.

Cette discussion générale a pour objectif de contextualiser les principaux résultats et observations rapportés dans cette thèse en les intégrant de manière séquentielle dans les processus pathogéniques de l'hépatite et des atteintes neurologiques dans le modèle d'infection aiguë causée par le MHV3. La contribution des avancées de cette thèse sera ensuite mise en relation avec les problématiques auxquelles font face les infections humaines causées par des coronavirus et des virus d'hépatite humaine. Ce chapitre se terminera par une ouverture vers des perspectives de recherches et d'applications en relation avec les avancées faites au cours de ces travaux.

#### **4.1- Rôles des anomalies fonctionnelles des LSEC et de l'activation du TLR2 dans la sévérité de l'hépatite aiguë causée par le MHV3**

Le sérotype MHV3 est le plus virulent des MHV, induisant une hépatite fulminante chez les souris susceptibles qui entraîne la mort dans les 3 à 5 jours p.i. (Le Prévost *et al.*, 1975). La virulence du sérotype MHV3 est associée à des dysfonctions hépatiques qui résultent d'une réplication virale élevée et de l'induction d'une réponse immunopathologique responsables d'une nécrose hépatocellulaire extensive (Lamontagne & Jolicoeur, 1994). Cependant, les mécanismes primaires qui prédisposent à l'induction de cette réponse inflammatoire délétère sont peu connus. Étant donné que les LSEC sont les principales cellules responsables de la tolérance hépatique (Tiegs & Lohse, 2010) et qu'elles comptent parmi les premières à être infectées par le MHV3 (Martin *et al.*, 1994), nous avons postulé que des anomalies fonctionnelles précoces, résultant de l'infection virale dans ces cellules, pourraient conduire à un bris de tolérance hépatique et à une réponse inflammatoire incontrôlée favorisant l'aggravation de l'hépatite. Cette hypothèse était soutenue par des observations histopathologiques antérieures qui avaient révélé une altération de la microcirculation des sinusoides et du nombre de fenestrations des LSEC dans les premières heures p.i. (Levy *et al.*, 1983; Steffan *et al.*, 1995). Nous avons démontré au chapitre 3 (article 3) que l'infection productive des LSEC *in vitro* par le MHV3 était associée à des dommages cellulaires et à une réversion de leur phénotype tolérogénique au profit d'un phénotype pro-inflammatoire. En effet, l'infection des LSEC par le MHV3 se traduisait par une inhibition de la production des

cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- $\beta$  et une stimulation de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'alarmine IL-33, les cytokines IL-6 et TNF- $\alpha$  et les chimiokines CXCL1, CXCL10 et CCL2 dès 24h p.i. Une production de cytokines et de chimiokines inflammatoires par les LSEC a déjà été observée suite à une infection par le cytomégalovirus et le virus de la dengue, (Peyrefitte *et al.*, 2006, Connolly *et al.*, 2010; Kern *et al.*, 2010), supportant l'hypothèse que l'infection des LSEC favorise leur conversion vers un phénotype inflammatoire. L'importance d'une infection robuste des LSEC dans l'induction d'un phénotype pro-inflammatoire a été démontrée à l'aide des virus atténués 51.6- et YAC-MHV3. Le variant 51.6-MHV3, sélectionné suite à une infection sur des cellules L2 en présence d'anticorps monoclonaux neutralisants dirigés contre la protéine de surface S (A51 et A37), se distingue du sérotype parental MHV3 par une absence de tropisme pour les LSEC (Martin *et al.*, 1994) et l'induction d'une hépatite aiguë moins sévère (Lamontagne *et al.*, 1994) alors que le variant non pathogène YAC-MHV3, généré suite à une infection persistante par le MHV3 dans la lignée cellulaire lymphoïde YAC-1, démontre un faible taux répliatif dans les macrophages et induit une hépatite sub-clinique (Lamontagne & Dupuy, 1984). L'infection des LSEC avec ces variants n'était pas associée à une réversion de leurs propriétés tolérogéniques et corrélait *in vivo* avec des niveaux plus faibles de cytokines pro-inflammatoires et des dommages hépatiques moins sévères que ceux induits par le MHV3, démontrant l'importance du maintien de l'équilibre tolérance/inflammation ainsi que de l'intégrité fonctionnelle des LSEC dans l'évolution de la gravité de l'hépatite. Nous avons démontré que la forte permissivité des LSEC à la répliation du MHV3, au contraire des variants 51.6- et YAC-MHV3, était associée à une faible induction virale de la production d'IFN- $\beta$  par ces cellules. Il est donc proposé que le contrôle précoce de la répliation des variants 51.6- et YAC-MHV3 par les LSEC dans les sinusoides diminue la charge virale entrant dans le parenchyme hépatique. Cette hypothèse est supportée par des titres viraux plus faibles des variants dans le foie à tous les temps p.i. en comparaison avec le MHV3.

L'induction des réponses inflammatoires et innées dans le foie est subséquente à la détection de la présence virale par les PRR, tels que les TLR et hélicases, exprimés par les cellules hépatiques (revue dans Nakamoto & Kanai, 2014). Les TLR endosomaux et les hélicases



cytosoliques sont généralement les senseurs les plus importants dans la détection des infections virales (Broering *et al.*, 2011). Quoiqu'il était connu que le TLR7 et l'hélicase MDA-5 sont les senseurs activés lors d'infections par différents sérotypes de MHV (Cervantes-Barragan *et al.*, 2007; Roth-Cross *et al.*, 2008), ceux impliqués dans les infections par le MHV3 n'avaient pas été rapportés à l'exception d'une étude ayant montré que la reconnaissance de la protéine S du MHV3 par le TLR2, et non par le récepteur viral CEACAM1a, était responsable de l'induction des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- $\alpha$  dans le foie de souris infectées (Jacques *et al.*, 2009b). Ces résultats suggèrent un rôle important du TLR2 dans la réponse inflammatoire induite lors d'infection par le MHV3. En comparant l'infection de souris C57Bl/6 et TLR2 KO par le MHV3, nous avons démontré que les niveaux intrahépatiques des cytokines IL-6, TNF- $\alpha$  de même que les chimiokines CXCL1, CXCL10, CCL2 et l'alarmine IL-33 étaient fortement diminués chez les souris TLR2 KO, corrélant avec des dommages hépatiques moins sévères et un prolongement de la survie des animaux (Chap.3 article 2). Il est connu que l'activation du TLR2 déclenche les cascades de signalisation menant à l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 nécessaires à l'induction des médiateurs pro-inflammatoires (revue dans Newton & Dixit, 2012). Nos observations non seulement démontrent le rôle particulier du TLR2 dans l'aggravation de l'hépatite induite par le MHV3 mais suggèrent aussi que la fixation du MHV3 au TLR2 à la surface des cellules hépatiques l'exprimant est un facteur déterminant dans la fulminance de l'hépatite et dans l'exacerbation de la réponse inflammatoire hépatique. Ce rôle aggravant du TLR2 a d'ailleurs récemment été mis en évidence dans la réponse inflammatoire et la sévérité de l'hépatite aiguë expérimentale induites par la ConA (Zhou *et al.*, 2014). De plus, la fixation de certains virus, tel que l'entérovirus 71, au TLR2 a été montré comme un facteur exacerbant la production de cytokines inflammatoires (Gong *et al.*, 2012). D'autre part, l'infection des souris C57Bl/6 par le MHV3 entraînait aussi une augmentation considérable de l'expression du TLR2 dans le foie alors qu'elle n'affectait peu ou pas l'expression des autres PRRs (TLR3, TLR4, TLR7, RIG-1, MDA-5). Ce résultat suggère non seulement une implication plus importante du TLR2 que les autres PRR dans la reconnaissance virale mais aussi une augmentation subséquente de la réponse inflammatoire par la fixation de la progéniture virale aux cellules hépatiques sur-exprimant le TLR2. L'approche *in vivo* n'a pas permis d'identifier

le mécanisme responsable de cette induction spécifique. Étant donné la faible induction des PRR par le MHV3, une voie de signalisation indépendante des PRR est probablement impliquée dans l'induction du TLR2. Il est néanmoins probable que la fixation du MHV3 au TLR2 stimule directement sa propre expression puisque la transcription du gène TLR2 est sous la dépendance de la voie MyD88, et cette voie est activée par la signalisation du TLR2 (Hu *et al.*, 2007). Une augmentation de l'expression du TLR2 par le virus murin de Theiler a déjà été rapportée sur des astrocytes infectés mais était consécutive à l'induction et l'activation préalables du TLR3 par le virus (So & Kim, 2009). Des infections *in vivo* avec le virus MHV3 chez des souris KO pour le TLR3 et/ou le MyD88 ou *in vitro*, sur des cellules traitées avec des siRNAs ciblant ces voies, pourraient confirmer ou non leur rôle dans l'induction du TLR2.

Plusieurs cellules hépatiques résidentes, dont les hépatocytes, les KC et les LSEC, sont reconnues pour exprimer le TLR2 et répondre à son activation par la production de cytokines et chimiokines (revue dans Nakamoto & Kanai, 2014). Les LSEC et les KC des sinusoides sont les premières cellules à être infectées par les MHV hépatotropes (Martin *et al.*, 1994; Wijburg *et al.*, 1996). L'induction et l'activation précoce du TLR2 par le MHV3 sur ces cellules, avant même son entrée dans le parenchyme hépatique, pourrait promouvoir la production rapide de facteurs inflammatoires qui favoriseraient le bris de la tolérance hépatique. Nous avons observé que l'infection *in vitro* des LSEC par le MHV3, au contraire des variants 51.6- et YAC-MHV3, augmentait fortement leur expression du TLR2. D'autre part, en abrogeant l'expression du TLR2 sur les LSEC par des siRNA, nous avons déterminé que l'induction de CXCL1 et d'IL-6 par le MHV3, et non par les variants atténués, était dépendante du TLR2 (chap. 3, article 3). Nos résultats sont en accord avec ceux de Liu *et al.* (2013) qui ont récemment démontré que l'activation des LSEC par un ligand TLR2 renversait leur phénotype tolérogénique en promouvant l'induction de cytokines inflammatoires. Par ailleurs, ce phénomène n'était pas observé lorsque les cellules étaient stimulées avec d'autres ligands TLR, démontrant l'importance du TLR2 dans l'activation inflammatoire des LSEC. Les KC des sinusoides sont les principales cellules hépatiques responsables de l'induction de l'immunité innée et de la réponse inflammatoire lors d'infections virales (Kowalewska *et al.*, 2011). Il avait préalablement été rapporté que le MHV3 induisait *in vitro* la production rapide

d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  par des macrophages via l'activation du TLR2 (Jacques *et al.*, 2009b). Cette propriété d'activer le TLR2 à la surface des macrophages serait spécifique au sérotype MHV3 puisque qu'aucune production de cytokines pro-inflammatoires dépendantes du TLR2 n'a été observée chez des macrophages infectés avec le sérotype MHV-A59 (Zhou *et al.*, 2012). Comparativement à l'hépatite fulminante induite par le MHV3, le MHV-A59 cause une hépatite modérée suivie par l'élimination du virus dans les 8 à 10 jours p.i. (Godfraind & Coutelier, 1998), suggérant que les dommages hépatiques moins sévères corrélaient avec une réponse inflammatoire atténuée par l'incapacité de ce sérotype à se fixer au TLR2 sur les KC ou d'autres cellules hépatiques exprimant le TLR2. En accord avec cette hypothèse, nous avons démontré que le MHV-A59 n'induisait pas l'expression du TLR2 dans le foie et que la production des cytokines IL-6, TNF- $\alpha$  de même que les chimiokines CXCL1, CXCL10 et CCL2 étaient beaucoup moins importantes chez les souris infectées avec le MHV-A59, atteignant des niveaux similaires à ceux des souris TLR2 KO infectées avec le MHV3 (Chap.3, article 2).

Plusieurs facteurs inflammatoires induits lors de l'hépatite aiguë causée par le MHV3 ont été associés avec une aggravation des lésions. Il a été rapporté que l'induction de TNF- $\alpha$  corrélait avec la fulminance de l'hépatite, tel que démontré par une diminution drastique de la nécrose hépatique et une survie fortement améliorée chez les souris déficientes en TNF- $\alpha$  ou son récepteur TNFR1 (Xu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015). Cette cytokine est rapidement produite lors d'infection par le MHV3 puisque des concentrations sériques de TNF- $\alpha$  sont décelables dès 24 h p.i., avant même la détection du virus dans le foie (Devictor *et al.*, 1992). Ces observations suggèrent que la production rapide de TNF- $\alpha$  pourrait provenir des LSECs et/ou des KCs infectées dans les sinusoides suite à la fixation du virus au TLR2. Corroborant cette hypothèse, des niveaux de TNF- $\alpha$  étaient observables dès 24 h p.i. seulement chez les souris C57BL/6 infectées avec le MHV3 et non avec les variants 51.6- et YAC-MHV3 ou chez les souris TLR2 KO infectées avec le MHV3 (Chap. 3, articles 2 et 3). Par ailleurs, il a aussi été démontré que la production du facteur pro-coagulant fgl2 par les LSEC lors de l'infection par le MHV3 déclenchait une thrombose microvasculaire associée à une nécrose hépatocellulaire importante (Ding *et al.*, 1997). Nous avons effectivement observé que les infections *in vivo* et

*in vitro* des LSECs par le MHV3 induisaient des niveaux plus importants de fgl2 qu'avec les variants atténués 51.6- et YAC-MHV3 mais seulement à partir de 48 h p.i. (Chap. 3, article 3). Cependant, le fgl2 n'était pas diminué chez les souris TLR2 KO infectées par le MHV3 et les souris C57Bl/6 infectées avec le MHV-A59 (Chap. 3, article 2). Ces observations suggèrent plutôt un impact secondaire et/ou tardif du fgl2 dans le processus pathogénique de l'hépatite tout en étant indépendant de l'activation du TLR2.

Il a aussi été rapporté que certaines chimiokines produites en excès dans le foie, dont la CXCL1 et la CLXC10, pouvaient contribuer directement à l'hépatotoxicité et la pathophysiologie (Stefanovic *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 1998). Nous avons montré que les LSEC infectées *in vitro* par le MHV3 produisaient d'importantes quantités de CXCL1 sous la dépendance du TLR2 (Chap. 3, article 3). Cependant, la production de chimiokines dans le foie est principalement sous le contrôle des KC et des hépatocytes (Stefanovic *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 1998), ces derniers produisant les niveaux les plus importants lors d'agression (Wasmuth *et al.*, 2010), avant même l'apparition des dommages hépatiques (Leifeld *et al.*, 2003). Exprimer le TLR2, l'activation de ces cellules par le virus pourrait être un facteur contributif significatif à la production hâtive et majeure de chimiokines et à la nécrose hépatocellulaire subséquente chez les souris C57Bl/6 infectées avec le MHV3. D'ailleurs, des résultats préliminaires obtenus sur une culture primaire d'hépatocytes rendus déficients pour l'expression du TLR2 ont révélé l'importance de ce senseur dans l'induction par le MHV3 de la production de chimiokines par ces cellules.

Les chimiokines jouent aussi un rôle déterminant dans le recrutement intrahépatique des cellules inflammatoires (Saiman & Friedman, 2012). En effet, la production plus importante de chimiokines dans le foie de souris C57Bl/6 infectées avec le MHV3, par rapport aux souris infectées avec le MHV-A59 ou aux souris TLR2 KO infectées avec le MHV3, se traduisait par un recrutement précoce (dès 24 h p.i.) de neutrophiles et de macrophages tel que montré lors des analyses par cytofluorométrie (Chap. 3, article 2). Il est possible que le recrutement hâtif de ces cellules participe, via leur production de cytokines et de chimiokines, à l'aggravation de la réponse inflammatoire et des lésions hépatiques suite à une activation du TLR2 sur ces cellules par le MHV3. Supportant cette hypothèse, l'examen histopathologique du foie des

souris C57Bl/6, et non des souris TLR2 KO, infectées avec le MHV3 révélait à 24h p.i. une présence de cellules inflammatoires localisées dans ou près des foyers nécrotiques. Cependant, ce recrutement était transitoire car dès 48 h p.i., les nombres de neutrophiles et de macrophages diminuaient alors qu'ils étaient maintenus ou augmentés chez les souris TLR2 KO infectées avec le MHV3 et les souris C57Bl/6 infectées avec le MHV-A59. Parallèlement, des diminutions spécifiques et/ou plus importantes des cellules NK et NK-T et des lymphocytes B et T étaient aussi observées. Il a déjà été montré que la chute des cellules NK et NK-T hépatiques était consécutive à une apoptose post-réplication (Lehoux *et al.*, 2004; Jacques *et al.*, 2008) et que les macrophages et les lymphocytes B et T étaient permissifs à l'infection par le MHV-3 et/ou diminués par conséquence des déficits cellulaires induits par le virus dans les organes lymphoïdes tels que la moelle osseuse, la rate et le thymus (Jolicoeur & Lamontagne, 1989; Lamontagne *et al.*, 1989a; Lamontagne *et al.*, 1989b; Lamontagne & Jolicoeur 1991). Des résultats préliminaires *in vitro* suggèrent aussi que les neutrophiles seraient permissifs au MHV3. Conséquemment, tous ces résultats indiquent que les pertes cellulaires résulteraient d'une infection virale plus généralisée, précédant ou suivant le recrutement intrahépatique des cellules inflammatoires, et qui serait favorisée par la présence du TLR2. D'ailleurs, toutes ces cellules sont connues pour exprimer le TLR2 (revue dans Nakamoto & Kanai, 2014).

Cette hypothèse est soutenue par la détection de titres viraux plus élevés dans le foie des souris C57Bl/6 que dans celui des souris TLR2 KO infectées (Chap. 3, article 2), suggérant un effet activateur du TLR2 sur la réplication virale. Cet effet activateur a d'ailleurs été confirmé dans l'infection des LSEC puisque la réplication du MHV3 était fortement diminuée dans les cellules dont l'expression du TLR2 avait été abrogée par des siRNA (Chap. 3, article 3). Il a été démontré que la réplication des MHVs dépendait de l'activation de la MAPK P38 au début du cycle réplcatif (Banerjee *et al.*, 2002). Étant donné que la signalisation induite par le TLR2 est associée à l'activation des MAPK, dont la P38 (Newton & Dixit, 2012), il est envisageable que la fixation du MHV3 au TLR2, avant même son entrée dans la cellule, prédispose à une réplication virale plus efficace. De plus, l'induction de l'expression du TLR2 par le MHV3 sur ces cellules pourrait favoriser davantage sa réplication.

D'autre part, la chute des populations leucocytaires pourrait aussi être reliée à la mort ou à la perturbation des fonctions vasculaires des LSEC induites par le MHV3, se traduisant par un recrutement moins efficace. En effet, contrairement à ce qui a été observé chez les souris infectées par le MHV3, la plupart des populations leucocytaires étaient augmentées ou non affectées à 48 h p.i. dans le foie des souris infectées avec les variants 51.6- et YAC-MHV3 (Chap. 3, article 3), démontrant l'importance de l'intégrité des LSEC dans le recrutement leucocytaire. L'extravasation des leucocytes circulants au travers des sinusoides dépend d'une vasodilatation locale qui favorise, en diminuant la vitesse du flux sanguin, les interactions avec les molécules d'adhésion de l'endothélium (Danese *et al.*, 2007). Nous avons démontré que le MHV3, au contraire des variants atténués, diminuait la production de NO par les LSEC, un facteur vasodilatant important dans la régulation du débit sanguin des sinusoides (Yokomori *et al.*, 2012) (Chap. 3, article 3). Il est proposé que cette diminution se traduise par une hypertension sinusoidale qui compromettrait un recrutement leucocytaire efficace. Supportant cette hypothèse, une oblitération des sinusoides a déjà été rapportée dans l'hépatite aiguë induite par le MHV3 (Bloch *et al.*, 1975).

Nonobstant le mécanisme impliqué, la chute des populations cellulaires de l'immunité innée observée chez les souris C57Bl/6 infectées avec le MHV3 pourrait compromettre l'efficacité de la défense anti-virale et contribuer à la fulminance de l'hépatite induite par ce sérotype. En effet, il a été rapporté que l'élimination *in vivo* des cellules NK aggravait l'hépatite induite par le MHV3 (Bukowski *et al.*, 1983). Un rôle important des macrophages dans le contrôle de la réplication du MHV3 par la production d'IFN- $\beta$  a aussi récemment été suggéré (Mazaleuskaya *et al.*, 2012). D'ailleurs, Wijburg *et al.* (1997) ont montré que l'hépatite modérée induite par le MHV-A59 était associée au recrutement et à l'activité anti-virale des macrophages puisque l'infection de souris déficientes en macrophages se traduisait par une hépatite fulminante et la mort des animaux en moins de quatre jours. Des résultats préliminaires suggèrent aussi que la perte des neutrophiles contribue à la sévérité de l'hépatite induite par le MHV3 puisque l'élimination des neutrophiles chez les souris, préalablement à l'infection, entraînait une mortalité précoce des animaux. Le rôle des neutrophiles lors d'infections par des MHV est peu connu mais il a été démontré dans le modèle d'infection aiguë par le sérotype neurotrope MHV-JHM, que l'infiltration intracérébrale des neutrophiles était cruciale pour limiter la

réplication virale (Zhou *et al.*, 2003). Bref, ces observations suggèrent que la chute des cellules NK, macrophages et neutrophiles nuise à la défense anti-virale, conduisant ainsi à une réplication virale et des effets pathogéniques plus importants.

Dans l'ensemble, ces résultats mettent donc en évidence l'importance de l'intégrité des LSEC dans le maintien d'un équilibre tolérance/inflammation favorisant une réponse anti-virale efficace tout en limitant les dommages associés à un excès de médiateurs inflammatoires. L'infection des LSEC par le MHV3, combinée à l'activation du TLR2 sur les cellules hépatiques, dont les LSEC, seraient des facteurs déterminants dans la sévérité de l'hépatite associée à des dysfonctions de l'immunité innée et à une exacerbation délétère de la réponse inflammatoire, de la réplication virale et des dommages hépatiques.

#### **4.2- Rôle des anomalies fonctionnelles et structurales des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (BHE) dans l'invasion cérébrale du MHV3 lors d'infection aiguë**

Le SNC est protégé contre l'invasion par la plupart des virus hématogènes (Hase *et al.*, 1990; Kobilier *et al.*, 1989; Lustig *et al.*, 1992) par l'étanchéité de la BHE, assurée par le système complexe de jonctions serrées et les mécanismes de défenses innées des cellules endothéliales (BMEC) (Spindler & Hsu, 2012; Lampron *et al.*, 2013). Certains virus ciblant des organes périphériques pour leur réplication primaire, tels que le HIV-1 et le WNV, ont néanmoins acquis des stratégies d'invasion de cette barrière pour induire secondairement des neuropathologies (revue dans Swanson & McGavern, 2015), impliquant que l'efficacité des mécanismes viraux et/ou des réponses innées des BMEC à l'interface de la BHE varie selon la nature des virus. Il a été rapporté que plusieurs souches de coronavirus murins et humains démontraient un potentiel neurotropique (Arbour *et al.*, 2000; Bender & Weiss, 2010) mais les mécanismes d'invasion du SNC n'ont pas clairement été élucidés. Il a été préalablement démontré que l'infection par voie i.p. avec le sérotype fortement virulent MHV3, à la différence du sérotype moyennement virulent MHV-A59, pouvait se disséminer au cerveau après une réplication primaire dans le foie (Virelizier *et al.*, 1975; Lavi *et al.*, 1986), suggérant

une restriction différentielle de l'invasion cérébrale par la BHE selon les sérotypes. Nous avons démontré pour la première fois, dans l'article 1 (Chap. 3), la capacité pour des coronavirus murins circulant par voie hématogène d'envahir le SNC au niveau de la BHE en fonction de leur tropisme et leur virulence pour le foie. En effet, nous avons montré que l'invasion cérébrale par le sérotype fortement virulent MHV3 seulement corrélait avec une répllication virale primaire dans le foie plus importante que celle du MHV-A59. Ce mécanisme d'invasion du SNC prend toute son importance chez les souris dites semi-susceptibles, qui développent une maladie neurologique après avoir survécu à la phase aiguë de l'hépatite (Virelizier *et al.*, 1975). Il a été démontré, chez ces souris, que l'immunodéficience périphérique induite lors de l'infection aiguë par le MHV3 prédisposait à la persistance virale et à la neuropathogenèse (Lamontagne *et al.*, 1986). Ainsi, les déficits en cellules inflammatoires intrahépatiques pourraient contribuer à une élimination moins efficace du MHV3 qui favoriserait par le fait même une charge virale plus forte en circulation sanguine et une invasion cérébrale secondaire. De plus, les déficits partiels en cellules lymphocytaires dans les organes lymphoïdes diminuent possiblement le recrutement des lymphocytes à l'interface de la BHE et dans le SNC, compromettant l'efficacité de la réponse immune adaptative anti-virale (Lamontagne *et al.*, 1986).

Par ailleurs, nous avons démontré *in vivo* et *in vitro*, sur une lignée de BMEC, que l'invasion cérébrale du MHV3 résultait de dysfonctions structurales et fonctionnelles chez les BMEC induites par l'infection virale. En effet, le MHV3, au contraire du MHV-A59, altérait fortement l'expression des protéines de jonction occludine, VE-cadhérine et ZO-1 chez les BMEC conduisant à une augmentation de la perméabilité de la BHE et au transit viral subséquent dans le SNC. L'induction d'un bris de la BHE, secondaire à une infection primaire périphérique, a déjà été rapportée lors d'infections par le HIV-1, le WNV et le HTLV (revue dans Spindler & Hsu, 2012). Le HIV-1 peut aussi envahir indirectement le SNC par le mécanisme dit du « cheval de Troie » suite à une infiltration cérébrale de monocytes périphériques infectés (Alexaki & Wigdahl, 2008). Bien que les monocytes soient des cibles pour le MHV3 (Dindzans *et al.*, 1985), il est peu probable que ce mécanisme soit impliqué dans l'invasion cérébrale, puisque le variant 51.6-MHV3, affichant un tropisme identique au



MHV3 pour les macrophages mais plus faible pour les EC, était indétectable dans le cerveau des souris infectées (Chap. 3, article 1).

L'altération des protéines de jonction chez les BMEC peut résulter de dommages causés par l'infection virale elle-même, comme démontré lors d'infection par le MAV-1 (Gralinski *et al.*, 2009), ou de dommages collatéraux causés par des cytokines et chimiokines inflammatoires induites par l'infection virale, comme lors d'infections par le HIV-1, le JEV ou le HTLV (revue dans Spindler & Hsu, 2012; Chen *et al.*, 2014; Afonso *et al.*, 2007). L'infection des BMEC par le MHV3 n'a pas conduit à des effets cytopathiques ou à la mort cellulaire mais néanmoins à une réplication virale plus importante que celle du MHV-A59. Un faible tropisme du MHV-A59 pour les BMEC, malgré l'expression fonctionnelle du récepteur viral CEACAM1a, avait déjà été observé mais son mécanisme n'a pas été élucidé (Godfraind *et al.*, 1997). Par l'utilisation d'ARN interférents spécifiques, nous avons démontré que le récepteur viral CEACAM1a était effectivement essentiel à l'infection des BMEC par les virus MHV-A59 et MHV3, mais que l'utilisation combinée, par le MHV3 seulement, des voies endocytaires dépendantes de la clathrine et de la cavéoline optimisait son entrée dans les cellules. Par ailleurs, tout comme dans l'infection des LSEC, la fixation du MHV3 au TLR2 favorisait sa réplication dans les BMEC, alors que celle du MHV-A59 était peu influencée par le TLR2. Cependant, l'infection des BMEC par le MHV3, au contraire du MHV-A59, n'induisait pas la production de cytokines et de chimiokines inflammatoires, impliquant que le mécanisme sous-jacent à l'altération des protéines de jonctions serrées par le MHV3 est probablement indépendant des médiateurs inflammatoires. Le mécanisme reste à définir mais il est proposé que la fixation du MHV3 au TLR2 serait en partie impliquée dans le bris de la BHE puisqu'il a été rapporté que l'activation du TLR2 sur les BMEC entraînait une augmentation de la perméabilité de la BHE associée à une réduction de l'expression de l'occludine (Nagyoszi *et al.*, 2010). D'autre part, nous avons démontré que l'absence de dommages cellulaires et d'invasion de la BHE observés lors d'infection par le MHV-A59, en dépit de la présence de facteurs inflammatoires, étaient reliés à l'induction spécifique d'IFN- $\beta$  par les BMEC infectés avec ce sérotype. Contrairement aux médiateurs inflammatoires, l'IFN- $\beta$  est reconnu pour promouvoir la synthèse des protéines de jonction et stabiliser la BHE

(Kraus *et al.*, 2004). En accord avec nos observations, l'IFN- $\beta$  peut prévenir le passage transendothélial du WNV *in vitro* en contrecarrant les dommages médiés par les cytokines induites par le virus (Daniels *et al.*, 2014). L'effet protecteur de l'IFN- $\beta$  a été confirmé par l'ajout exogène d'IFN- $\beta$  aux cultures de BMEC infectées par le MHV3 qui prévenait alors l'altération des protéines de jonction et l'augmentation de la perméabilité induites par le virus. Ces résultats indiquent donc que l'invasion cérébrale du MHV3 est associée à un bris de la BHE, résultant d'une altération des protéines de jonctions serrées sur les BMEC combinée à une inhibition ou une absence d'induction, par le virus, de la production d'IFN- $\beta$  protecteur par ces cellules.

L'absence de production de cytokines inflammatoires et d'IFN- $\beta$  par les BMEC infectées avec le MHV3 suggèrent des mécanismes d'évasion virale de la reconnaissance par les PRR. Par ailleurs, comme le MHV3 induisait fortement la production de cytokines et chimiokines inflammatoires chez les LSEC (Chap. 3, article 3), ces mécanismes d'évasion seraient possiblement spécifiques de la nature de la cellule-hôte. Une induction différentielle d'IFN- $\beta$  selon la nature de la cellule infectée a déjà été rapportée avec le MHV-A59 (revue dans Rose & Weiss, 2009). D'autre part, il a été suggéré que la réplication virale des MHV s'effectuait transitoirement à l'intérieur de vésicules à double membrane dérivées possiblement du réticulum endoplasmique (revue dans King *et al.*, 2011). Ces structures pourraient alors protéger l'ARN viral de la détection par les senseurs viraux endosomaux et/ou cytoplasmiques. Il est aussi possible que l'utilisation par le MHV3 de la voie endosomale dépendante de la cavéoline pour l'entrée dans les BMEC soit un mécanisme permettant la séquestration des particules et l'évitement de la détection par les PRR. En accord avec cette hypothèse, Itoh *et al.* (2008) ont rapporté que la voie endocyttaire dépendante de la clathrine était plus importante que celle de la cavéoline dans l'induction de l'IFN- $\beta$  en réponse à des ARNdb viraux. De plus, advenant un échec de l'évasion des PRR, plusieurs protéines virales des MHV, produites lors du cycle réplcatif, ont montré des capacités d'inhibition de la production et/ou de la signalisation des IFN de type I (Ye *et al.*, 2007; Züst *et al.*, 2007), suggérant une possibilité d'interférence avec la signalisation par les PRR. À cet égard, il a récemment été rapporté que l'activation des TLR2, TLR4 et TLR7, au contraire du TLR3,

n'affectait pas la production de MHV3 infectieux chez des macrophages (Mazaleuskaya *et al.*, 2012). Il est donc possible que la fixation du MHV3 au TLR2 des BMEC favorise l'infection mais que le virus interfère postérieurement avec la voie de signalisation du TLR2 ou d'autres TLR, empêchant la production de cytokines.

Contrairement au MHV3, l'induction de cytokines, chimiokines et d'IFN- $\beta$  par le MHV-A59 dans les BMEC pourrait représenter un facteur restrictif additionnel à son entrée dans le SNC en favorisant une défense anti-virale robuste à l'interface de la BHE. Il a été démontré que les IFN de type I étaient indispensables au contrôle de l'infection virale cérébrale aiguë par le MHV-A59 (Roth-Cross *et al.*, 2007). Nous avons en effet observé que l'ajout d'IFN- $\beta$  aux BMEC infectées avec le MHV-A59 supprimait sa réplication virale, alors que sa neutralisation par des anticorps l'augmentait, supportant un rôle majeur de l'activité antivirale de l'IFN- $\beta$  dans le contrôle de l'infection par le MHV-A59. Le recrutement rapide de monocytes/macrophages en réponse aux chimiokines produites par les BMEC pourrait aussi contribuer à l'élimination virale. En effet, il a récemment été rapporté que la production du facteur anti-viral IFIT-2 par des macrophages activés via l'IFN- $\beta$ , diminuait drastiquement la réplication virale et la sévérité de l'encéphalite induite par le MHV-A59 (Butchi *et al.*, 2014).

Les résultats de notre étude rapportent pour la première fois la possibilité d'invasion de la BHE par les MHV suivant une voie non-neurale d'infection. Nous avons montré que le bris de la BHE par le MHV3, secondaire à l'infection hépatique, était préalable à l'entrée du virus dans le SNC, étape essentielle au développement d'une neuropathie. En effet, l'induction précoce d'un bris de la BHE favoriserait l'invasion cérébrale par des virions infectieux du MHV en provenance des organes périphériques permissifs, contribuant ainsi à l'établissement de la maladie neurologique. D'ailleurs, l'importance du bris de la BHE dans l'invasion du SNC par le MHV3 se reflète dans son tropisme cérébral pour les régions fortement vascularisées que sont les méninges et les plexus choroïdiens (Virelizier *et al.*, 1975; Tardieu *et al.*, 1982; Tardieu *et al.*, 1986). Les conséquences d'un bris de la BHE lors d'infections virales peuvent être bénéfiques ou défavorables dans le développement de l'infection neurologique. Il a été rapporté que le bris de la BHE induit lors d'infections par le virus de la

rage et le WNV était nécessaire à une infiltration leucocytaire optimale qui favorisait l'élimination virale et la survie (Chai *et al.*, 2014; Klein *et al.*, 2005). Au contraire, lors d'infection par le HIV-1, l'infiltration des monocytes est associée à la production de facteurs inflammatoires neurotoxiques qui aggravent la neuropathie (Williams *et al.*, 2014). Le rôle du bris de la BHE lors d'infections cérébrales par des MHV est peu connu. Il a été démontré dans le modèle d'infection intracérébrale par le MHV-JHM que le bris de la BHE, initié suite à la production de MMP par des neutrophiles, était pré-requis pour l'infiltration des leucocytes et une défense anti-virale efficace lors de la phase aiguë de l'infection (Zhou *et al.*, 2003).

Dans l'ensemble, les résultats de cette étude mettent donc en évidence l'importance de l'intégrité des BMEC dans la prévention de l'invasion cérébrale par les MHV suite à une dissémination virale par voie hématogène.

#### **4.3- Contribution des résultats de la recherche pour la compréhension des infections par les coronavirus humains et les virus d'hépatites humaines**

Chez l'humain, les infections par les CoV se traduisent essentiellement par des complications des voies respiratoires supérieures qui sont associées à environ 30% des rhumes communs (Berry *et al.*, 2015; Reina *et al.*, 2014). Cependant, l'infection par le SARS-CoV, causant un syndrome respiratoire sévère aigu, est associée à une réponse inflammatoire responsable de dommages pulmonaires importants et de dysfonctions multi-organes causant la mort chez 10% des individus infectés (He *et al.*, 2006). Il a été démontré que la protéine S du SARS-CoV, à l'instar de celle du MHV3, pouvait se lier au TLR2 sur des monocytes (Dosch *et al.*, 2009), mais les conséquences de l'activation du TLR2 dans la pathogenèse du SARS sont inconnues. Les résultats avancés dans cette thèse avec le modèle murin de l'infection par le MHV3 permettent de penser que l'activation du TLR2 par le SARS-CoV pourrait contribuer à l'immunopathologie en exacerbant la réponse inflammatoire par les macrophages résidents ou recrutés dans les poumons et, par extension, aggraver les lésions pulmonaires.

Le passage de virions du SARS-CoV vers le SNC suite à une réplication primaire dans les poumons semble aussi possible dans le SARS. Effectivement, des particules virales et des ARN viraux du SARS-CoV et, aussi des HCoV-229E et -OC43 lors d'atteintes pulmonaires, ont été retrouvés dans le cerveau de patients infectés (Arbour *et al.*, 2000; Gu *et al.*, 2005), suggérant un potentiel neuroinvasif pour les CoV humains. Par contre, les mécanismes et l'importance de l'invasion du SNC dans le développement d'atteintes neurologiques ne sont pas clairement élucidés. Par leur forte prévalence dans le cerveau des patients atteints de la sclérose en plaques, les virus HCoV-229E et -OC43 ont déjà été proposés comme agents étiologiques potentiels de la maladie (Murray *et al.*, 1992; Stewart *et al.*, 1992; Arbour *et al.*, 2000). L'étiologie de la sclérose en plaques demeure incertaine mais les agents viraux sont fortement suspectés comme éléments déclencheurs de la maladie chez les individus prédisposés génétiquement (Cusick *et al.*, 2013; Kakalacheva *et al.*, 2011). Comme nous avons démontré pour la première fois que des coronavirus circulant par voie hématogène pouvaient transiter vers le SNC au niveau de la BHE en fonction de leur degré de virulence, il est possible que des coronavirus humains possèdent des propriétés similaires d'invasion du SNC. Ces propriétés restent à démontrer mais il a déjà été rapporté que le HCoV 229E pouvait infecter les BMEC (Cabirac *et al.*, 1995). Des travaux ultérieurs seront requis afin d'identifier les interactions BMEC-virus qui pourraient prédisposer à une perturbation de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la BHE lors d'infections humaines par des CoV.

Par ailleurs, plusieurs évidences suggèrent que des dysfonctions au niveau de la BHE précèdent et engendrent l'infiltration leucocytaire responsable de la démyélinisation dans la pathogenèse de la sclérose en plaques (Noseworthy *et al.*, 2000). Grâce au modèle murin de l'infection par le virus MHV3, nous avons démontré que l'infection aiguë entraînait le bris de la BHE et une infiltration subséquente de cellules inflammatoires dès 72 h p.i. Le traitement de première ligne actuellement privilégié pour la forme rémittente-récurrente de la sclérose en plaques repose sur l'utilisation d'IFN- $\beta$  recombinant. Les effets bénéfiques de l'IFN- $\beta$  sont multiples mais sont associés, entre autre, à ses propriétés anti-inflammatoires et de stabilisation de la BHE (Kieseier, 2011; Kraus *et al.*, 2004). Nous avons clairement montré que l'IFN- $\beta$  prévenait *in vitro* le bris de la BHE induit par le MHV3 et la migration virale

transendothéliale subséquente. Ainsi, l'utilisation précoce d'IFN- $\beta$  lors d'infections par des agents viraux susceptibles d'être liés à la sclérose en plaques pourrait possiblement prévenir l'induction virale du bris et l'infiltration consécutive de lymphocytes T potentiellement auto-réactifs dans le SNC.

Lors d'infections hépatiques par les virus HCV et HBV, l'induction d'une réponse immune innée efficace est cruciale dans le contrôle précoce de l'infection et l'initiation subséquente de la réponse adaptative antivirale qui, dans certains cas, préviendra l'évolution vers une forme chronique (Barnaba, 2010). Dans quelques cas, pour des raisons encore incomprises, l'infection aiguë peut évoluer vers une forme fulminante caractérisée par une nécrose hépatocellulaire extensive et une inflammation exacerbée causant la mort dans plus de 80% des cas (Liu *et al.*, 2001). Il est bien admis que les dommages hépatiques associés aux infections par HBV/HCV résultent d'abord d'un désordre immunopathologique plutôt que des conséquences de la réplication virale elle-même (Moriyama *et al.*, 1990; Bortolami *et al.*, 2008). Un équilibre entre la protection et les dommages hépatiques médiés par la réponse immune lors de la phase aiguë serait critique dans l'évolution de l'hépatite (Barnaba, 2010). La contribution des LSEC à cet équilibre est encore inconnue. Contrairement au MHV3, les LSEC ne supportent pas l'infection par les HCV et HBV mais jouent un rôle important dans la capture par transcytose des particules circulantes et leur transmission vers les hépatocytes (Breiner *et al.*, 2001; Pöhlmann *et al.*, 2003). Par leur expression de différents TLR, elles pourraient donc rapidement détecter la présence virale dans les sinusoides et déclencher une réponse inflammatoire. D'ailleurs, une étude très récente a démontré que l'ARN du HCV induisait l'expression de cytokines inflammatoires et de chimiokines sur une lignée de cellules endothéliales microvasculaires humaines via l'activation du TLR3 (Pircher *et al.*, 2014). Nos résultats supportent l'hypothèse d'un rôle aggravant des LSEC dans l'induction d'une réponse inflammatoire pathologique, qui serait en partie dépendante de l'induction et l'activation virales du TLR2. Il est intéressant de noter que les protéines « core » des HCV et HBV peuvent interagir avec le TLR2 et induire la production *in vitro* de cytokines inflammatoires chez des monocytes et des macrophages (Cooper *et al.*, 2005; Dolganiuc *et al.*, 2004). En conséquence, il est proposé que des interactions des HCV/HBV avec le TLR2 à la surface des

LSEC et des cellules de l'immunité innée dans la phase aiguë de l'infection favorisent une réponse inflammatoire exacerbée et des dysfonctions hépatiques qui prédisposeraient au développement d'une hépatite fulminante. Une activation des voies de signalisation enclenchées par les PRRs a d'ailleurs récemment été associée à l'hépatite fulminante et à des niveaux élevés de transaminases (Kadowaki *et al.*, 2013).

Quoique l'importance des travaux de cette thèse serve davantage à la compréhension de la physiopathologie des hépatites fulminantes virales humaines, le modèle d'hépatite aiguë induite par le MHV3 apporte néanmoins quelques pistes intéressantes dans la compréhension du rôle pathologique de l'inflammation dans les hépatites virales chroniques humaines. Par exemple, à l'instar de nos observations avec le modèle MHV3, une sur-expression du TLR2 dans le foie, corrélant avec les niveaux de cytokines inflammatoires et les dommages hépatiques, a été rapportée chez des patients infectés chroniquement par le HCV et le HBV (Berzsenyi *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2015; Riordan *et al.*, 2006). Nous avons démontré que la sur-expression du TLR2 dans le foie et à la surface des LSEC était induite directement par l'infection virale et était préférentielle à l'expression d'autres PRR. Conséquemment, l'activation du TLR2 par des protéines « core » libres du HCV et du HBV, relarguées suite à la nécrose hépatocytaire, pourrait également jouer un rôle dans la progression des désordres inflammatoires caractéristiques de la phase chronique de l'infection. D'ailleurs, l'infection chronique par le HCV est associée à une activation des KC, exprimant le TLR2, et le relargage de médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-18 (McGuinness *et al.*, 2000). Cette hypothèse mériterait d'être approfondie puisqu'une désensibilisation de la réponse TLR2 suite à une activation continue par la protéine « core » du HCV a aussi été rapportée chez des monocytes de patients infectés chroniquement (Imran *et al.*, 2012). Par ailleurs, il a récemment été montré que l'interaction de la protéine « core » avec le TLR2 augmentait la réplication du HIV-1 dans les macrophages (Swaminathan *et al.*, 2014), suggérant un effet potentialisateur du TLR2 sur la réplication du HIV-1 chez des patients co-infectés par le HCV et le HIV-1.

Des recherches récentes ont aussi rapporté une relation positive entre l'augmentation de l'expression du TLR2 et le risque de complications des hépatites chroniques vers le

développement d'une cirrhose et d'un carcinome hépatocellulaire (CHC). Par exemple, Lu *et al.* (2014) ont rapporté que l'expression du TLR2 sur les PBMC augmentait parallèlement avec la progression de l'infection chronique par HBV vers le CHC. Une régulation à la hausse du TLR2 a aussi été observée dans le foie de patients infectés par le HCV et souffrant de cirrhose mais pas du CHC (Soares *et al.*, 2012). La relation fonctionnelle entre le TLR2 et le développement de la cirrhose ou du CHC n'est pas encore définie mais des mécanismes directs et indirects pourraient être impliqués. Par exemple, il a été démontré que la signalisation intracellulaire via MyD88, qui se traduit par l'activation de NF- $\kappa$ B et de JNK, est la principale voie menant à l'induction du CHC (Liang *et al.*, 2013; Maeda, 2010). Puisque la signalisation par le TLR2 implique la voie MyD88, son activation pourrait stimuler la tumorigenèse chez les patients atteints de l'hépatite B ou C chronique. Par ailleurs, il est connu que des taux élevés de cholestérol sont prédictors de la cirrhose (Janicko *et al.*, 2013). Li *et al.* (2013) ont démontré que le HBV induisait l'expression de gènes liés au métabolisme du cholestérol et son accumulation dans la lignée hépatocytaire HepG2 via la voie TLR2. Conséquemment, l'activation de la signalisation du TLR2 durant la phase chronique de l'infection pourrait faciliter le développement de la cirrhose en modulant le métabolisme du cholestérol. Enfin, l'inflammation est aussi reconnue comme une des principales causes de l'induction de la séquence fibrose-cirrhose-CHC chez les patients atteints d'hépatite virale chronique (Matsuzaki *et al.*, 2007 ; Tarao *et al.*, 2013). Nous avons montré que la réponse inflammatoire hépatique durant l'infection virale était fortement dépendante du TLR2 et de la transition des LSEC vers un phénotype pro-inflammatoire. À cet effet, Connolly *et al.* (2010) ont démontré que les LSEC adoptaient un statut fortement inflammatoire dans les foies humains fibrotiques et qu'elles représentaient un élément critique de l'inflammation intrahépatique caractéristique de la fibrose hépatique. Ainsi, l'activation soutenue des LSEC et du TLR2 par les protéines virales « core » durant la phase chronique de l'infection par le HBV et le HCV pourrait, via la production des cytokines pro-fibrosantes TNF- $\alpha$  et TGF- $\beta$  (Zhou *et al.*, 2014), favoriser le développement de complications hépatiques telles que la cirrhose et le CHC. L'importance des protéines de surface du HCV dans ces processus a d'ailleurs été mise en évidence chez des souris transgéniques exprimant la protéine « core » qui développent une stéatose et un CHC (Moriya *et al.*, 1998)



Une augmentation des niveaux sériques d'IL-33, corrélant avec les niveaux d'AST/ALT, ont déjà été rapportés lors d'infections chroniques par le HCV et le HBV et proposée comme un facteur aggravant des lésions hépatiques (Wang *et al.* 2012a, 2012b). L'expression d'IL-33 et de son récepteur ST2 augmentent aussi proportionnellement avec la sévérité de la fibrose et de la cirrhose dans les foies de patients infectés chroniquement (Marvie *et al.*, 2010) et ont récemment été proposés comme biomarqueurs de l'évolution de la fibrose hépatique (Oztas *et al.*, 2015; Cacopardo *et al.*, 2012). Dans ces études, la source cellulaire d'IL-33 n'a pas été rapportée mais les observations issues de nos travaux suggèrent fortement l'implication des LSEC, et dans une moindre mesure, des hépatocytes infectés. De plus, Espinassous *et al.* (2009) ont démontré que l'IL-33 synergisait la réponse en cytokines inflammatoires induites par le TLR2. Ainsi, les effets combinés de l'augmentation de l'expression de l'IL-33 avec celle du TLR2 lors de la phase chronique de l'infection pourraient instaurer un milieu intrahépatique pro-inflammatoire favorable à l'induction de la fibrose et de la cirrhose hépatique.

Des modifications ultrastructurales des LSEC chez des patients infectés chroniquement par le HCV ont aussi été rapportées et proposées comme éléments cruciaux dans l'initiation de la fibrose péri-sinusoidale (Bardadin & Desmet, 1985). La défenestration des sinusoides hépatiques conduit à une perturbation importante des échanges sang-foie et est un facteur contributif majeur des dysfonctions hépatiques associées à la cirrhose (Babbs *et al.*, 1990). Les échanges sang-foie sont favorisés par la production locale du facteur vasodilatant NO, assurée par l'enzyme membranaire eNOS (endothelial NO synthase) des LSEC, localisée dans les fenestrations (Yokomori *et al.*, 2012). Les résultats présentés dans cette thèse démontrent une atteinte des fonctions vasculaires hépatiques par l'infection virale, associée à une réduction des niveaux de NO produits par les LSEC. Cette diminution corrèle inversement avec une augmentation de l'expression de la cavéoline-1 sur les LSEC, reconnue pour inhiber l'activité de la eNOS (Kamoun *et al.*, 2006; Kwok *et al.*, 2009). Il a été démontré *in vivo* que la restauration de la différenciation des LSEC et de leur production de NO promouvait la quiescence de l'activité pro-fibrosante des HSC, favorisait la régression de la fibrose, et prévenait la progression de la cirrhose (Deleve, 2015). À l'instar de nos observations, une augmentation de l'expression de la cavéoline-1 a été rapportée dans les foies cirrhotiques de

patients infectés par le HCV (Yokomori *et al.*, 2015). Il a été proposé que la surexpression de la cavéoline-1, en régulant à la baisse la production de NO, contribue à la résistance intravasculaire hépatique et à l'hypertension portale caractéristiques des patients cirrhotiques (Kwok *et al.*, 2009; Yokomori *et al.*, 2003). Cette résistance intravasculaire pourrait possiblement contribuer à la diminution du nombre de lymphocytes T CD8 dénotée chez les patients infectés chroniquement par le HBV et le HCV (Protzer *et al.*, 2012) puisque l'hypertension portale est associée à une réduction de l'adhésion et de la transmigration leucocytaire (Panés *et al.*, 1999).

D'autre part, bien que le virus HCV soit essentiellement hépatotrope, l'infection par le HCV est aussi associée à plusieurs syndromes extrahépatiques tels que la cryoglobulinémie et des neuropathologies chroniques (Hoofnagle, 2002). Récemment, des ARNs viraux génomiques ont été détectés dans le liquide céphalo-rachidien et le cerveau de patients chroniquement infectés (Weissenborn *et al.*, 2009), suggérant une invasion cérébrale du HCV par voie hématogène au niveau de la BHE. Supportant cette hypothèse, il a récemment été rapporté que les BMEC étaient permissives à la réplication du HCV (Fletcher *et al.*, 2012). Les conséquences de cette invasion dans le processus pathogénique sont peu connues mais le SNC ou les BMEC pourraient constituer un réservoir pour le HCV, à l'abri des réponses immunes systémiques et des molécules anti-virales thérapeutiques exclues du SNC par les pompes d'efflux des BMEC, tel que rapporté pour le HIV-1 (Löscher & Potschka, 2005). Une recherche des dommages potentiels résultant de l'infection des BMEC par le HCV serait souhaitable afin de prévenir les dommages collatéraux qu'un bris de la BHE pourrait occasionner chez les patients infectés chroniquement. Les mécanismes mis de l'avant dans cette thèse avec le modèle animal d'hépatite MHV3 proposent des pistes intéressantes d'interactions entre le HCV et les BMEC qui pourraient être à l'origine d'un bris de la BHE et une invasion virale subséquente du HCV dans le SNC.

#### 4.4- Conclusion et perspectives

L'objectif global de ce projet doctoral s'inscrivait dans un besoin de compréhension plus approfondie des interactions virus-EC et leurs conséquences dans les désordres immunitaires et la pathogenèse lors d'infections virales aiguës. À l'aide du modèle d'infection aiguë par les virus MHV, nous avons montré que la virulence et le tropisme des MHV pour les EC hépatiques et cérébrales se traduisait par d'importantes anomalies fonctionnelles et structurales contribuant d'abord à l'aggravation de l'hépatite puis secondairement à une dissémination virale par voie hématogène et une invasion subséquente du SNC.

Les résultats novateurs de ce travail serviront de premiers jalons à des études ultérieures sur les interactions virus-cellules hôtes et les désordres fonctionnels de la réponse inflammatoire qui prédisposent à un bris de la tolérance hépatique et de la BHE lors d'infections virales aiguës. Suggérant une implication potentielle du TLR2 dans l'aggravation de l'hépatite virale aiguë, nos observations ouvrent aussi sur la possibilité d'envisager des nouvelles avenues thérapeutiques visant à moduler l'activité inflammatoire du TLR2 par des anticorps ou des inhibiteurs spécifiques.

Certains des phénomènes observés dans ce travail mériteraient davantage de recherche sur les mécanismes impliqués. En effet, il serait important de déterminer le mécanisme à l'origine de l'altération des protéines de jonctions des BMEC par le MHV3. Nous avons démontré que les médiateurs inflammatoires et la mortalité cellulaire n'étaient pas impliqués suggérant donc un nouveau mécanisme par lequel un virus peut provoquer le bris de la BHE. L'implication probable du TLR2, telle que suggérée, reste à confirmer sur des souris TLR2 KO et des BMEC purifiées de ces souris ou traités avec des siRNA dirigés contre le TLR2. Le cas échéant, les molécules de signalisation activées par le TLR2 et impliquées dans l'inhibition de l'expression des protéines de jonction devront être déterminées. Il apparaît aussi essentiel d'élucider les mécanismes d'évasion et/ou d'inhibition par le MHV3 qui entravent la production de cytokines, de chimiokines et d'IFN- $\beta$  par les BMEC infectées. Une activation préférentielle du TLR2 présuppose l'existence de mécanismes de régulation et d'interaction

entre les différentes voies de signalisation induites par les TLR et les hélicases. Dans un tel contexte, une infection virale pourrait s'échapper des mécanismes anti-viraux médiés préférentiellement par les TLR endosomaux et les hélicases en activant plutôt un TLR de surface, moins prompt à une défense anti-virale efficace.

D'autre part, il serait important de déterminer le rôle des populations cellulaires hépatiques résidentes ou recrutées, autres que les LSEC, impliquées dans l'exacerbation précoce de la réponse inflammatoire dépendante du TLR2 et l'aggravation de l'hépatite. Les KC, les HSC de même que les neutrophiles recrutés devraient d'abord être ciblés étant donné leurs interactions directes avec les LSEC et leur capacité à produire des cytokines inflammatoires en réponse à une activation par le TLR2 (revue dans Nakamoto & Kanai, 2014). Il serait intéressant de déterminer les déficits fonctionnels induits par l'infection virale et l'activation du TLR2 sur ces populations cellulaires purifiées et leurs conséquences dans la perturbation du recrutement tardif des populations leucocytaires ou dans la destruction cellulaire. Tel que mentionné précédemment, des résultats préliminaires laissent croire que les neutrophiles aient un rôle protecteur plutôt qu'aggravant dans la pathogenèse. Des mécanismes protecteurs par les neutrophiles impliquant la phagocytose, la production d'agents antiviraux et de NET (neutrophil extracellular traps) ou des interactions essentielles avec d'autres cellules de l'immunité innée ont récemment été rapportés lors d'infections par les virus influenza de type A et les filovirus (Ebola et Marburg) (revue dans Galani & Andreacos, 2015). Fort de tous ces résultats, il sera alors possible de modéliser et de disséquer l'impact de l'infection virale et de l'activation du TLR2 sur les fonctions des différentes cellules résidentes et recrutées de l'immunité innée intrahépatique ainsi que leurs interactions, dans le processus d'aggravation de l'hépatite aiguë.

## **5- RÉFÉRENCES**

Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(1), 41–53. <http://doi.org/10.1038/nrn1824>

Abdel-Misih, S. R. Z., & Bloomston, M. (2010). Liver anatomy. *The Surgical Clinics of North America*, 90(4), 643–53. <http://doi.org/10.1016/j.suc.2010.04.017>

Afonso, P. V., Ozden, S., Prevost, M.-C., Schmitt, C., Seilhean, D., Weksler, B., Couraud P.O., Gessain A., Romero I.A., & Ceccaldi, P.-E. (2007). Human blood-brain barrier disruption by retroviral-infected lymphocytes: role of myosin light chain kinase in endothelial tight-junction disorganization. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(4), 2576–83.

Alexaki, A., & Wigdahl, B. (2008). HIV-1 infection of bone marrow hematopoietic progenitor cells and their role in trafficking and viral dissemination. *PLoS Pathogens*, 4(12), e1000215. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000215>

Almeida, J. D., & Tyrrell, D. A. (1967). The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. *The Journal of General Virology*, 1(2), 175–8.

Altfeld, M., Fadda, L., Frleta, D., & Bhardwaj, N. (2011). DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nature Reviews. Immunology*, 11(3), 176–86. <http://doi.org/10.1038/nri2935>

Ancuta, P., Wang, J., & Gabuzda, D. (2006). CD16+ monocytes produce IL-6, CCL2, and matrix metalloproteinase-9 upon interaction with CX3CL1-expressing endothelial cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(5), 1156–64. <http://doi.org/10.1189/jlb.0206125>

Andrade, W. A., Souza, M. do C., Ramos-Martinez, E., Nagpal, K., Dutra, M. S., Melo, M. B., Bartholomeu D.C., Ghosh S., Golenbock D.T., & Gazzinelli, R. T. (2013). Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. *Cell Host & Microbe*, 13(1), 42–53. <http://doi.org/10.1016/j.chom.2012.12.003>

Anlar, B., Soylemezoglu, F., Aysun, S., Kose, G., Belen, D., & Yalaz, K. (2001). Tissue Inflammatory Response in Subacute Sclerosing Panencephalitis (SSPE). *Journal of Child Neurology*, 16(12), 895–900. <http://doi.org/10.1177/088307380101601206>

Arbour, N., Day, R., Newcombe, J., & Talbot, P. J. (2000). Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. *Journal of Virology*, 74(19), 8913–21.

Arshad, M. I., Patrat-Delon, S., Piquet-Pellorce, C., L'Helgoualc'h, A., Rauch, M., Genet, V., Lucas-Clerc C., Bleau C., Lamontagne L. & Samson, M. (2013). Pathogenic Mouse Hepatitis Virus or Poly(I:C) Induce IL-33 in Hepatocytes in Murine Models of Hepatitis. *PLoS ONE*, 8(9).

Arshad, M. I., Piquet-Pellorce, C., Filliol, A., L'Helgoualc'h, A., Lucas-Clerc, C., Jouan-Lanhouet, S., Dimanche-Boitrel M.T., & Samson, M. (2015). The chemical inhibitors of cellular death, PJ34 and Necrostatin-1, down-regulate IL-33 expression in liver. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*. <http://doi.org/10.1007/s00109-015-1270-6>

Arshad, M. I., Piquet-Pellorce, C., & Samson, M. (2012). IL-33 and HMGB1 alarmins: Sensors of cellular death and their involvement in liver pathology. *Liver International*, 32(8), 1200–1210. <http://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2012.02802.x>

Arshad, M. I., Rauch, M., L'helgoualc'h, A., Julia, V., Leite-de-Moraes, M. C., Lucas-Clerc, C., Piquet-Pellorce, C., & Samson, M. (2011). NKT cells are required to induce high IL-33 expression in hepatocytes during ConA-induced acute hepatitis. *European Journal of Immunology*, 41(8), 2341–8. <http://doi.org/10.1002/eji.201041332>

Aurelius, E., Johansson, B., Sköldenberg, B., & Forsgren, M. (1993). Encephalitis in immunocompetent patients due to herpes simplex virus type 1 or 2 as determined by type-specific polymerase chain reaction and antibody assays of cerebrospinal fluid. *Journal of Medical Virology*, 39(3), 179–86.

Avraham, H. K., Jiang, S., Lee, T.-H., Prakash, O., & Avraham, S. (2004). HIV-1 Tat-mediated effects on focal adhesion assembly and permeability in brain microvascular endothelial cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(10), 6228–33.

Babbs, C., Haboubi, N. Y., Mellor, J. M., Smith, A., Rowan, B. P., & Warnes, T. W. (1990). Endothelial cell transformation in primary biliary cirrhosis: a morphological and biochemical study. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 11(5), 723–9.

Banerjee, S., Narayanan, K., Mizutani, T., & Makino, S. (2002). Murine coronavirus replication-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation promotes interleukin-6 production and virus replication in cultured cells. *Journal of Virology*, 76(12), 5937–48.

Baratta, J. L., Ngo, A., Lopez, B., Kasabwalla, N., Longmuir, K. J., & Robertson, R. T. (2009). Cellular organization of normal mouse liver: a histological, quantitative immunocytochemical, and fine structural analysis. *Histochemistry and Cell Biology*, 131(6), 713–26. <http://doi.org/10.1007/s00418-009-0577-1>

Barbalat, R., Lau, L., Locksley, R. M., & Barton, G. M. (2009). Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nature Immunology*, 10(11), 1200–7. <http://doi.org/10.1038/ni.1792>

- Bardadin, K.A., Desmet, V.J. (1985). Ultrastructural observations on sinusoidal endothelial cells in chronic active hepatitis. *Histopathology*, 9(2), 171-81.
- Barnaba, V. (2010). Hepatitis C virus infection: A “liaison a trois” amongst the virus, the host, and chronic low-level inflammation for human survival. *Journal of Hepatology*, 53(4), 752–761. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.06.003>
- Barnett, E. M., & Perlman, S. (1993). The olfactory nerve and not the trigeminal nerve is the major site of CNS entry for mouse hepatitis virus, strain JHM. *Virology*, 194(1), 185–91. <http://doi.org/10.1006/viro.1993.1248>
- Barton, G. M., & Kagan, J. C. (2009). A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nature Reviews. Immunology*, 9(8), 535–42. <http://doi.org/10.1038/nri2587>
- Bechmann, I., Galea, I., & Perry, V. H. (2007). What is the blood-brain barrier (not)? *Trends in Immunology*, 28(1), 5–11. <http://doi.org/10.1016/j.it.2006.11.007>
- Belouzard, S., Millet, J. K., Licitra, B. N., & Whittaker, G. R. (2012). Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*, 4(6), 1011–1033. <http://doi.org/10.3390/v4061011>
- Bender, S. J., & Weiss, S. R. (2010). Pathogenesis of murine coronavirus in the central nervous system. *Journal of Neuroimmune Pharmacology : The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 5(3), 336–54. <http://doi.org/10.1007/s11481-010-9202-2>
- Bergmann, C. C., Lane, T. E., & Stohlman, S. A. (2006). Coronavirus infection of the central nervous system: host-virus stand-off. *Nature Reviews. Microbiology*, 4(2), 121–32. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1343>
- Bergmann, C. C., Parra, B., Hinton, D. R., Chandran, R., Morrison, M., & Stohlman, S. A. (2003). Perforin-mediated effector function within the central nervous system requires IFN-gamma-mediated MHC up-regulation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(6), 3204–13.
- Bergmann, C., Dimacali, E., Stohl, S., Wei, W., Lai, M. M., Tahara, S., & Marten, N. (1998). Variability of persisting MHV RNA sequences constituting immune and replication-relevant domains. *Virology*, 244(2), 563–72. <http://doi.org/10.1006/viro.1998.9147>
- Bernal, W., Auzinger, G., Dhawan, A., & Wendon, J. (2010). Acute liver failure. *Lancet*, 376(9736), 190–201. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60274-7](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60274-7)
- Berry, M., Gamielien, J., & Fielding, B. C. (2015). Identification of new respiratory viruses in the new millennium. *Viruses*, 7(3), 996–1019. <http://doi.org/10.3390/v7030996>



Berzsenyi, M. D., Roberts, S. K., Preiss, S., Woollard, D. J., Beard, M. R., Skinner, N. A., Bowden, D.S., & Visvanathan, K. (2011). Hepatic TLR2 & TLR4 expression correlates with hepatic inflammation and TNF- $\alpha$  in HCV & HCV/HIV infection. *Journal of Viral Hepatitis*, 18(12), 852–60. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2010.01390.x>

Bieback, K., Lien, E., Klagge, I. M., Avota, E., Schneider-Schaulies, J., Duprex, W. P., Wagner H., Kirschning C.J., Ter Meulen V., & Schneider-Schaulies, S. (2002). Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *Journal of Virology*, 76(17), 8729–36.

Bissell, D. M., Wang, S. S., Jarnagin, W. R., & Roll, F. J. (1995). Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *The Journal of Clinical Investigation*, 96(1), 447–55. <http://doi.org/10.1172/JCI118055>

Bloch, E. H., Warren, K. S., & Rosenthal, M. S. (1975). In vivo microscopic observations of the pathogenesis of acute mouse viral hepatitis. *British Journal of Experimental Pathology*, 56(3), 256–64.

Bochtler, P., Riedl, P., Gomez, I., Schirmbeck, R., & Reimann, J. (2008). Local accumulation and activation of regulatory Foxp3<sup>+</sup> CD4 T(R) cells accompanies the appearance of activated CD8 T cells in the liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 48(6), 1954–63. <http://doi.org/10.1002/hep.22559>

Boer, M.C., van Meijgaarden, K.E., Joosten, S.A., & Ottenhoff, T.H. (2014). CD8<sup>+</sup> regulatory T cells, and not CD4<sup>+</sup> T cells, dominate suppressive phenotype and function after in vitro live *Mycobacterium bovis*-BCG activation of human cells. *PLoS One*. 9(4), e94192. <http://doi:10.1371/journal.pone.0094192>.

Bogdanos, D. P., Gao, B., & Gershwin, M. E. (2013). Liver immunology. *Comprehensive Physiology*, 3(2), 567–98. <http://doi.org/10.1002/cphy.c120011>

Bortolami, M., Kotsafti, A., Cardin, R., & Farinati, F. (2008). Fas / FasL system, IL-1beta expression and apoptosis in chronic HBV and HCV liver disease. *Journal of Viral Hepatitis*, 15(7), 515–22. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2008.00974.x>

Bouwens, L., De Bleser, P., Vanderkerken, K., Geerts, B., & Wisse, E. (1992). Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells. *Enzyme*, 46(1-3), 155–68.

Brass, A., & Brenndörfer, E. D. (2014). The role of chemokines in hepatitis C virus-mediated liver disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 4747–79. <http://doi.org/10.3390/ijms15034747>

Breiner, K. M., Schaller, H., & Knolle, P. A. (2001). Endothelial cell-mediated uptake of a hepatitis B virus: a new concept of liver targeting of hepatotropic microorganisms. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 34(4 Pt 1), 803–8. <http://doi.org/10.1053/jhep.2001.27810>

Broering, R., Lu, M., & Schlaak, J. F. (2011). Role of Toll-like receptors in liver health and disease. *Clinical Science* (London, England: 1979), 121(10), 415–26. <http://doi.org/10.1042/CS20110065>

Broering, R., Wu, J., Meng, Z., Hilgard, P., Lu, M., Trippler, M., Szczeponek A., Gerken G., & Schlaak, J. F. (2008). Toll-like receptor-stimulated non-parenchymal liver cells can regulate hepatitis C virus replication. *Journal of Hepatology*, 48(6), 914–922. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.01.028>

Brown, R. C., Morris, A. P., & O’Neil, R. G. (2007). Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain Research*, 1130(1), 17–30. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.10.083>

Bukowski, J. F., Woda, B. A., Habu, S., Okumura, K., & Welsh, R. M. (1983). Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 131(3), 1531–8.

Burdo, T. H., Lackner, A., & Williams, K. C. (2013). Monocyte/macrophages and their role in HIV neuropathogenesis. *Immunological Reviews*, 254(1), 102–13. <http://doi.org/10.1111/imr.12068>

Burgio, V. L., Ballardini, G., Artini, M., Caratozzolo, M., Bianchi, F. B., & Levrero, M. (1998). Expression of co-stimulatory molecules by Kupffer cells in chronic hepatitis of hepatitis C virus etiology. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 27(6), 1600–6. <http://doi.org/10.1002/hep.510270620>

Burkard, C., Verheije, M. H., Wicht, O., van Kasteren, S. I., van Kuppeveld, F. J., Haagmans, B. L., Pelkmans L., Rottier P.J., Bosch B.J., & de Haan, C. A. M. (2014). Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysis-dependent manner. *PLoS Pathogens*, 10(11), e1004502. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004502>

Busca, A., & Kumar, A. (2014). Innate immune responses in hepatitis B virus (HBV) infection. *Virology Journal*, 11, 22. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-11-22>

Butchi, N. B., Hinton, D. R., Stohlman, S. A., Kapil, P., Fensterl, V., Sen, G. C., & Bergmann, C. C. (2014). Ifit2 deficiency results in uncontrolled neurotropic coronavirus replication and enhanced encephalitis via impaired alpha/beta interferon induction in macrophages. *Journal of Virology*, 88(2), 1051–64. <http://doi.org/10.1128/JVI.02272-13>

Cabirac, G. F., Murray, R. S., McLaughlin, L. B., Skolnick, D. M., Hogue, B., Dorovini-Zis, K., & Didier, P. J. (1995). In vitro interaction of coronaviruses with primate and human brain microvascular endothelial cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 380, 79–88.

Cacopardo, B., Rita Pinzone, M., Palermo, F., & Nunnari, G. (2012). Changes in serum Interleukin-33 concentration before and after treatment with pegylated interferon alfa-2a plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C genotype 1b infection. *Hepat Mon.*, 12(12), e7611. <http://doi: 10.5812/hepatmon.7611>.

Carty, M., Goodbody, R., Schröder, M., Stack, J., Moynagh, P. N., & Bowie, A. G. (2006). The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nature Immunology*, 7(10), 1074–81. <http://doi.org/10.1038/ni1382>

Castro, R. F., Evans, G. D., Jaszewski, A., & Perlman, S. (1994). Coronavirus-induced demyelination occurs in the presence of virus-specific cytotoxic T cells. *Virology*, 200(2), 733–43. <http://doi.org/10.1006/viro.1994.1237>

Cervantes-Barragan, L., Züst, R., Weber, F., Spiegel, M., Lang, K. S., Akira, S., Thiel, V., & Ludewig, B. (2007). Control of coronavirus infection through plasmacytoid dendritic-cell-derived type I interferon. *Blood*, 109(3), 1131–1137. <http://doi.org/10.1182/blood-2006-05-023770>

Cervantes-Barragán, L., Kalinke, U., Züst, R., König, M., Reizis, B., López-Macías, C., Thiel, V., Ludewig, B. (2009). Type I IFN-mediated protection of macrophages and dendritic cells secures control of murine coronavirus infection. *J Immunol.* 182,1099-106.

Chai, Q., He, W. Q., Zhou, M., Lu, H., & Fu, Z. F. (2014). Enhancement of blood-brain barrier permeability and reduction of tight junction protein expression are modulated by chemokines/cytokines induced by rabies virus infection. *Journal of Virology*, 88(9), 4698–710. <http://doi.org/10.1128/JVI.03149-13>

Chai, Q., She, R., Huang, Y., & Fu, Z. F. (2015). Expression of neuronal CXCL10 induced by rabies virus infection initiates infiltration of inflammatory cells, production of chemokines and cytokines, and enhancement of blood-brain barrier permeability. *Journal of Virology*, 89(1), 870–6. <http://doi.org/10.1128/JVI.02154-14>

Chambers, T. J., & Diamond, M. S. (2003). Pathogenesis of flavivirus encephalitis. *Advances in Virus Research*, 60, 273–342.

Chao, C. C., Hu, S., Ehrlich, L., & Peterson, P. K. (1995). Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain, Behavior, and Immunity*, 9(4), 355–65.

Chen, C.-J., Ou, Y.-C., Li, J.-R., Chang, C.-Y., Pan, H.-C., Lai, C.-Y., Liao S.L., Raung S.L., & Chang, C.-J. (2014). Infection of pericytes in vitro by Japanese encephalitis virus disrupts the integrity of the endothelial barrier. *Journal of Virology*, 88(2), 1150–61. <http://doi.org/10.1128/JVI.02738-13>

Chen, L., Calomeni, E., Wen, J., Ozato, K., Shen, R., & Gao, J.-X. (2007). Natural killer dendritic cells are an intermediate of developing dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(6), 1422–33. <http://doi.org/10.1189/jlb.1106674>

Chen, Z., Cheng, Y., Xu, Y., Liao, J., Zhang, X., Hu, Y., Zhang Q., Wang J., Zhang Z., Shen F., Yuan, Z. (2008). Expression profiles and function of Toll-like receptors 2 and 4 in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B patients. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 128(3), 400–8. <http://doi.org/10.1016/j.clim.2008.04.006>

Compton, S. R., Rogers, D. B., Holmes, K. V, Fertsch, D., Remenick, J., & McGowan, J. J. (1987). In vitro replication of mouse hepatitis virus strain A59. *Journal of Virology*, 61(6), 1814–20.

Connolly, M. K., Bedrosian, A. S., Malhotra, A., Henning, J. R., Ibrahim, J., Vera, V., Cieza-Rubio N.E., Hassan B.U., Pachter H.L.,Cohen S., Frey A.B., & Miller, G. (2010). In hepatic fibrosis, liver sinusoidal endothelial cells acquire enhanced immunogenicity. *Journal of Immunology*, 185(4), 2200–8. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1000332>

Cooper, A., Tal, G., Lider, O., & Shaul, Y. (2005). Cytokine induction by the hepatitis B virus capsid in macrophages is facilitated by membrane heparan sulfate and involves TLR2. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(5), 3165–76.

Corse, E., & Machamer, C. E. (2003). The cytoplasmic tails of infectious bronchitis virus E and M proteins mediate their interaction. *Virology*, 312(1), 25–34.

Couraud, P. O. (1994). Interactions between lymphocytes, macrophages, and central nervous system cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 56(3), 407–15.

Coutelier, J. P., Godfraind, C., Dveksler, G. S., Wysocka, M., Cardellichio, C. B., Noël, H., & Holmes, K. V. (1994). B lymphocyte and macrophage expression of carcinoembryonic antigen-related adhesion molecules that serve as receptors for murine coronavirus. *European Journal of Immunology*, 24(6), 1383–90. <http://doi.org/10.1002/eji.1830240622>

Cowley, T. J., & Weiss, S. R. (2010). Murine coronavirus neuropathogenesis: determinants of virulence. *J Neurovirol.*, 16(6), 427–434. <http://doi.org/10.3109/13550284.2010.529238>.

Coyne, C. B., Kim, K. S., & Bergelson, J. M. (2007). Poliovirus entry into human brain microvascular cells requires receptor-induced activation of SHP-2. *The EMBO Journal*, 26(17), 4016–28. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601831>

Crispe, I. N. (2009). The liver as a lymphoid organ. *Annual Review of Immunology*, 27, 147–63. <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132629>

Cusick, M. F., Libbey, J. E., & Fujinami, R. S. (2013). Multiple sclerosis: autoimmunity and viruses. *Current Opinion in Rheumatology*, 25(4), 496–501. <http://doi.org/10.1097/BOR.0b013e328362004d>

Czosnyka, M., Czosnyka, Z., Momjian, S., & Pickard, J. D. (2004). Cerebrospinal fluid dynamics. *Physiological Measurement*, 25(5), R51–76.

Da Conceição, T. M., Rust, N. M., Berbel, A. C. E. R., Martins, N. B., do Nascimento Santos, C. A., Da Poian, A. T., & de Arruda, L. B. (2013). Essential role of RIG-I in the activation of endothelial cells by dengue virus. *Virology*, 435(2), 281–292. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.038>

Dalloul, A. (2009). CD5: a safeguard against autoimmunity and a shield for cancer cells. *Autoimmunity Reviews*, 8(4), 349–53. <http://doi.org/10.1016/j.autrev.2008.11.007>

Damy, S. B., Vassão, R. C., Lucchiari, M. A., Pereira, C. A., & Sant'Anna, O. A. (1992). A comparative study of resistance to MHV3 infection in genetically homogeneous and heterogeneous mouse populations. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et Al.]*, 25(10), 1025–7.

Danese, S., Dejana, E., & Fiocchi, C. (2007). Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(10), 6017–22.

Daniels, B., & Klein, R. (2015). Viral sensing at the blood-brain barrier: New roles for innate immunity at the CNS vasculature. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 97(4), 372–379. <http://doi.org/10.1002/cpt.75>

Daniels, B. P., Holman, D. W., Cruz-orengo, L., Jujavarapu, H., Durrant, D. M., & Klein, S. (2014). Viral Pathogen-Associated Molecular Patterns Regulate Blood-Brain Barrier Integrity via Competing Innate Cytokine Signals, 5(5), 1–13. <http://doi.org/10.1128/mBio.01476-14>.Editor

Das, M., Sabio, G., Jiang, F., Rincón, M., Flavell, R. A., & Davis, R. J. (2009). Induction of hepatitis by JNK-mediated expression of TNF-alpha. *Cell*, 136(2), 249–60. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.017>

De Albuquerque, N., Baig, E., Ma, X., Zhang, J., He, W., Rowe, A., Habal M., Liu M., Shalev I., Downey G.P., Gorczynski R., Butany J., Leibowitz J., Weiss S.R., McGilvray I.D., Phillips M.J., Fish E.N., & Levy, G. A. (2006). Murine hepatitis virus strain 1 produces a clinically relevant model of severe acute respiratory syndrome in A/J mice. *Journal of Virology*, 80(21), 10382–94. <http://doi.org/10.1128/JVI.00747-06>

De Boer, A. G., & Gaillard, P. J. (2006). Blood-brain barrier dysfunction and recovery. *Journal of Neural Transmission* (Vienna, Austria: 1996), 113(4), 455–62. <http://doi.org/10.1007/s00702-005-0375-4>

De Groot, R. J., Baker, S. C., Baric, R. S., Brown, C. S., Drosten, C., Enjuanes, L., Fouchier R.A., Galiano M., Gorbalenya A.E., Memish Z.A., Perlman S., Poon L.L., Snijder E.J., Stephens G.M., Woo P.C., Zaki A.M., Zambon M., & Ziebuhr, J. (2013). Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *Journal of Virology*, 87(14), 7790–2. <http://doi.org/10.1128/JVI.01244-13>

De Haan, C. A. M., Li, Z., te Lintelo, E., Bosch, B. J., Haijema, B. J., & Rottier, P. J. M. (2005). Murine coronavirus with an extended host range uses heparan sulfate as an entry receptor. *Journal of Virology*, 79(22), 14451–6. <http://doi.org/10.1128/JVI.79.22.14451-14456.2005>

De Haan, C. A. M., Te Lintelo, E., Li, Z., Raaben, M., Wurdinger, T., Bosch, B. J., & Rottier, P. J. M. (2006). Cooperative involvement of the S1 and S2 subunits of the murine coronavirus spike protein in receptor binding and extended host range. *Journal of Virology*, 80(22), 10909–18. <http://doi.org/10.1128/JVI.00950-06>

De Nardo, D. (2015). Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine*. <http://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.02.025>

Decaro, N., Mari, V., Campolo, M., Lorusso, A., Camero, M., Elia, G., Martella V., Cordioli P., Enjuanes L., & Buonavoglia, C. (2009). Recombinant canine coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus of Swine are circulating in dogs. *Journal of Virology*, 83(3), 1532–7. <http://doi.org/10.1128/JVI.01937-08>

Décimo, D., Boespflug, O., Meunier-Rotival, M., Hadchouel, M., & Tardieu, M. (1993). Genetic restriction of murine hepatitis virus type 3 expression in liver and brain: comparative study in BALB/c and C3H mice by immunocytochemistry and hybridization in situ. *Archives of Virology*, 130(3-4), 269–77.

DeDiego, M. L., Alvarez, E., Almazán, F., Rejas, M. T., Lamirande, E., Roberts, A., Shieh W.J., Zaki S.R., Subbarao K., & Enjuanes, L. (2007). A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *Journal of Virology*, 81(4), 1701–13. <http://doi.org/10.1128/JVI.01467-06>

Deleve, L.D. (2015). Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis. *Hepatology*. *Hepatology*, 61(5), 1740-6. <http://doi: 10.1002/hep.27376>.

Denison, M. R., Graham, R. L., Donaldson, E. F., Eckerle, L. D., & Baric, R. S. (2011). Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. *RNA Biology*, 8(2), 270–9.

Devictor, D., Decimo, D., Sebire, G., Tardieu, M., & Hadchouel, M. (1992). Enhanced tumor necrosis factor alpha in coronavirus but not in paracetamol-induced acute hepatic necrosis in mice. *Liver*, 12(4 Pt 1), 205–8.

Diehl, L., Schurich, A., Grochtmann, R., Hegenbarth, S., Chen, L., & Knolle, P. A. (2008). Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8+ T cell tolerance. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 47(1), 296–305. <http://doi.org/10.1002/hep.21965>

Dietrich, N., Lienenklaus, S., Weiss, S., & Gekara, N. O. (2010). Murine Toll-Like Receptor 2 Activation Induces Type I Interferon Responses from Endolysosomal Compartments. *PLoS ONE*, 5(4). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0010250>

Dindzans, V. J., MacPhee, P. J., Fung, L. S., Leibowitz, J. L., & Levy, G. A. (1985). The immune response to mouse hepatitis virus: expression of monocyte procoagulant activity and plasminogen activator during infection in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 135(6), 4189–97.

Ding, J. W., Ning, Q., Liu, M. F., Lai, A., Leibowitz, J., Peltekian, K. M., Cole E.H., Fung L.S., Holloway C., Marsden P.A., Yeger H,Phillips M.J., & Levy, G. A. (1997). Fulminant hepatic failure in murine hepatitis virus strain 3 infection: tissue-specific expression of a novel fgl2 prothrombinase. *Journal of Virology*, 71(12), 9223–30.

Ding, J. W., Ning, Q., Liu, M. F., Lai, A., Peltekian, K., Fung, L., Holloway C., Yeger H., Phillips M.J., & Levy, G. A. (1998). Expression of the fgl2 and its protein product (prothrombinase) in tissues during murine hepatitis virus strain-3 (MHV-3) infection. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 440, 609–18.

Dolganiuc, A., Oak, S., Kodys, K., Golenbock, D. T., Finberg, R. W., Kurt-Jones, E., & Szabo, G. (2004). Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology*, 127(5), 1513–24.

Dong, W., Simeonova, P. P., Gallucci, R., Matheson, J., Fannin, R., Montuschi, P., Flood L., & Luster, M. I. (1998). Cytokine expression in hepatocytes: role of oxidant stress. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 18(8), 629–38.

Dosch, S. F., Mahajan, S. D., & Collins, A. R. (2009). SARS coronavirus spike protein-induced innate immune response occurs via activation of the NF-kappaB pathway in human monocyte macrophages in vitro. *Virus Research*, 142(1-2), 19–27. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.01.005>

Drosten, C., Günther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.-R., Becker, S., Rabenau H., Panning M., Kolesnikova L., Fouchier R.A., Berger A., Burguière A.M., Cinatl J., Eickmann M., Escriou N., Grywna K., Kramme S., Manuguerra J.C., Müller S., Rickerts V., Stürmer M., Vieth S., Klenk H.D., Osterhaus A.D., Schmitz H., & Doerr, H. W. (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 348(20), 1967–76. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa030747>

Duperray, A., Barbe, D., Raguenez, G., Weksler, B. B., Romero, I. A., Couraud, P.-O., Perron H., & Marche, P. N. (2015). Inflammatory response of endothelial cells to a human endogenous retrovirus associated with multiple sclerosis is mediated by TLR4. *International Immunology*. <http://doi.org/10.1093/intimm/dxv025>

Dupuy, J. M., Levey-Leblond, E., & Le Prevost, C. (1975). Immunopathology of mouse hepatitis virus type 3mii. effect of immunosuppression in resistant mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 114(1 Pt 1), 226–30.

Dupuy, J. M., & Rodrigue, D. (1981). Heterogeneity in evolutive patterns of inbred mice infected with a cloned substrain of mouse hepatitis virus type 3. *Intervirology*, 16(2), 114–7.

Dveksler, G. S., Pensiero, M. N., Cardellichio, C. B., Williams, R. K., Jiang, G. S., Holmes, K. V., & Dieffenbach, C. W. (1991). Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV. *Journal of Virology*, 65(12), 6881–91.

Eifart, P., Ludwig, K., Böttcher, C., de Haan, C. A. M., Rottier, P. J. M., Korte, T., & Herrmann, A. (2007). Role of endocytosis and low pH in murine hepatitis virus strain A59 cell entry. *Journal of Virology*, 81(19), 10758–68. <http://doi.org/10.1128/JVI.00725-07>

Enjuanes, L., Almazán, F., Sola, I., & Zuñiga, S. (2006). Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interaction. *Annual Review of Microbiology*, 60, 211–30. <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142157>

Errett, J. S., Suthar, M. S., McMillan, A., Diamond, M. S., & Gale, M. (2013). The essential, nonredundant roles of RIG-I and MDA5 in detecting and controlling West Nile virus infection. *Journal of Virology*, 87(21), 11416–25. <http://doi.org/10.1128/JVI.01488-13>

Esiri, M. M., Oppenheimer, D. R., Brownell, B., & Haire, M. (1982). Distribution of measles antigen and immunoglobulin-containing cells in the CNS in subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) and atypical measles encephalitis. *Journal of the Neurological Sciences*, 53(1), 29–43. [http://doi.org/10.1016/0022-510X\(82\)90078-8](http://doi.org/10.1016/0022-510X(82)90078-8)



Espinassous, Q., Garcia-de-Paco, E., Garcia-Verdugo, I., Synguelakis, M., von Aulock, S., Sallenave, J.-M., McKenzie A.N., & Kanellopoulos, J. (2009). IL-33 enhances lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production from mouse macrophages by regulating lipopolysaccharide receptor complex. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(2), 1446–55. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0803067>

Fine, M., Llaguno, M. C., Lariccia, V., Lin, M.-J., Yaradanakul, A., & Hilgemann, D. W. (2011). Massive endocytosis driven by lipidic forces originating in the outer plasmalemmal monolayer: a new approach to membrane recycling and lipid domains. *The Journal of General Physiology*, 137(2), 137–54. <http://doi.org/10.1085/jgp.201010469>

Fischer, F., Stegen, C. F., Masters, P. S., & Samsonoff, W. A. (1998). Analysis of constructed E gene mutants of mouse hepatitis virus confirms a pivotal role for E protein in coronavirus assembly. *Journal of Virology*, 72(10), 7885–94.

Fitzgerald, K. A., Palsson-McDermott, E. M., Bowie, A. G., Jefferies, C. A., Mansell, A. S., Brady, G., Brint E., Dunne A., Gray P., Harte M.T., McMurray D., Smith D.E., Sims J.E., Bird T.A., & O'Neill, L. A. (2001). Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*, 413(6851), 78–83. <http://doi.org/10.1038/35092578>

Fletcher, N. F., Wilson, G. K., Murray, J., Hu, K., Lewis, A., Reynolds, G. M., Stamataki Z., Meredith L.W., Rowe I.A., Luo G., Lopez-Ramirez M.A., Baumert T.F., Weksler B., Couraud P.O., Kim K.S., Romero I.A., Jopling C., Morgello S., Balfe P., & McKeating, J. A. (2012). Hepatitis C virus infects the endothelial cells of the blood-brain barrier. *Gastroenterology*, 142(3), 634–643.e6. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.11.028>

Foerster, K., Helmy, A., Zhu, Y., Khattar, R., Adeyi, O. A., Wong, K. M., Shalev I., Clark D.A., Wong P.Y., Heathcote E.J., Phillips M.J., Grant D.R., Renner E.L., Levy G.A., & Selzner, N. (2010). The novel immunoregulatory molecule FGL2: a potential biomarker for severity of chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*, 53(4), 608–15. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.04.020>

Gack, M. U. (2014). Mechanisms of RIG-I-like receptor activation and manipulation by viral pathogens. *Journal of Virology*, 88(10), 5213–6. <http://doi.org/10.1128/JVI.03370-13>

Galani, I. E., & Andreakos, E. (2015). Neutrophils in viral infections: Current concepts and caveats. *Journal of Leukocyte Biology*. <http://doi.org/10.1189/jlb.4VMR1114-555R>

Gallagher, T. M., Escarmis, C., & Buchmeier, M. J. (1991). Alteration of the pH dependence of coronavirus-induced cell fusion: effect of mutations in the spike glycoprotein. *Journal of Virology*, 65(4), 1916–28.

Gallagher, T. M., Parker, S. E., & Buchmeier, M. J. (1990). Neutralization-resistant variants of a neurotropic coronavirus are generated by deletions within the amino-terminal half of the spike glycoprotein. *Journal of Virology*, 64(2), 731–41.

Ganesan, L. P., Mohanty, S., Kim, J., Clark, K. R., Robinson, J. M., & Anderson, C. L. (2011). Rapid and efficient clearance of blood-borne virus by liver sinusoidal endothelium. *PLoS Pathogens*, 7(9), e1002281. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002281>

Gay, N. J., Gangloff, M., & O'Neill, L. A. J. (2011). What the Myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity. *Trends in Immunology*, 32(3), 104–9. <http://doi.org/10.1016/j.it.2010.12.005>

Géraud, C., Evdokimov, K., Straub, B. K., Peitsch, W. K., Demory, A., Dörflinger, Y., Schledzewski K., Schmieder A., Schemmer P., Augustin H.G., Schirmacher P., & Goerdts, S. (2012). Unique cell type-specific junctional complexes in vascular endothelium of human and rat liver sinusoids. *PLoS ONE*, 7(4), 1–12. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0034206>

German, A. C., Myint, K. S. A., Mai, N. T. H., Pomeroy, I., Phu, N. H., Tzartos, J., Winter P., Collett J., Farrar J., Barrett A., Kipar A., Esiri M.M., & Solomon, T. (2006). A preliminary neuropathological study of Japanese encephalitis in humans and a mouse model. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(12), 1135–45. <http://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.02.008>

Ghanekar, A., Mendicino, M., Liu, H., He, W., Liu, M., Zhong, R., Phillips M.J., Levy G.A., & Grant, D. R. (2004). Endothelial induction of fgl2 contributes to thrombosis during acute vascular xenograft rejection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(9), 5693–701.

Giugliano, S., Kriss, M., Golden-Mason, L., Dobrinskikh, E., Stone, A. E. L., Soto-Gutierrez, A., Mitchell A., Khetani S.R., Yamane D., Stoddard M., Li H., Shaw G.M., Edwards M.G., Lemon S.M., Gale M. Jr., Shah V.H., & Rosen, H. R. (2015). Hepatitis C virus infection induces autocrine interferon signaling by human liver endothelial cells and release of exosomes, which inhibits viral replication. *Gastroenterology*, 148(2), 392–402.e13. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.10.040>

Goddard, S., Youster, J., Morgan, E., & Adams, D. H. (2004). Interleukin-10 secretion differentiates dendritic cells from human liver and skin. *The American Journal of Pathology*, 164(2), 511–9. [http://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63141-0](http://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63141-0)

Godfraind, C., & Coutelier, J. P. (1998). Morphological analysis of mouse hepatitis virus A59-induced pathology with regard to viral receptor expression. *Histology and Histopathology*, 13(1), 181–99.

Godfraind, C., Havaux, N., Holmes, K. V, & Coutelier, J. P. (1997). Role of virus receptor-bearing endothelial cells of the blood-brain barrier in preventing the spread of mouse hepatitis virus-A59 into the central nervous system. *Journal of Neurovirology*, 3(6), 428–34.

Godfraind, C., Langreth, S. G., Cardellicchio, C. B., Knobler, R., Coutelier, J. P., Dubois-Dalcq, M., & Holmes, K. V. (1995). Tissue and cellular distribution of an adhesion molecule in the carcinoembryonic antigen family that serves as a receptor for mouse hepatitis virus. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 73(5), 615–27.

Gohda, J., Matsumura, T., & Inoue, J. (2004). Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(5), 2913–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15322147>

Gong, X., Zhou, J., Zhu, W., Liu, N., Li, J., Li, L., Jin Y., & Duan, Z. (2012). Excessive proinflammatory cytokine and chemokine responses of human monocyte-derived macrophages to enterovirus 71 infection. *BMC Infectious Diseases*, 12, 224. <http://doi.org/10.1186/1471-2334-12-224>

Gralinski, L. E., Ashley, S. L., Dixon, S. D., & Spindler, K. R. (2009). Mouse adenovirus type 1-induced breakdown of the blood-brain barrier. *Journal of Virology*, 83(18), 9398–9410. <http://doi.org/10.1128/JVI.00954-09>

Gralinski, L. E., & Baric, R. S. (2015). Molecular pathology of emerging coronavirus infections. *The Journal of Pathology*, 235(2), 185–95. <http://doi.org/10.1002/path.4454>

Greicius, G., Severinson, E., Beauchemin, N., Obrink, B., & Singer, B. B. (2003). CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex-induced activation. *Journal of Leukocyte Biology*, 74(1), 126–34.

Grewe, M., Duyster, J., Dieter, P., Henninger, H., Schulze-Specking, A., & Decker, K. (1992). Prostaglandin D2 and E2 syntheses in rat Kupffer cells are antagonistically regulated by lipopolysaccharide and phorbol ester. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 373(8), 655–64.

Griffin, D. E. (2014). Measles virus and the nervous system. *Handbook of Clinical Neurology*, 123, 577–90. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-53488-0.00027-4>

Gu, J., Gong, E., Zhang, B., Zheng, J., Gao, Z., Zhong, Y., Zou W., Zhan J., Wang S., Xie Z., Zhuang H., Wu B., Zhong H., Shao H., Fang W., Gao D., Pei F., Li X., He Z., Xu D., Shi X., Anderson V.M., & Leong, A. S.-Y. (2005). Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(3), 415–24. <http://doi.org/10.1084/jem.20050828>

Guénet, J.-L. (2005). Assessing the genetic component of the susceptibility of mice to viral infections. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 4(3), 225–40.

Guzmán-Fulgencio, M., Berenguer, J., de Castro, I. F., Micheloud, D., López, J. C., Cosín, J., Miralles P., Lorente R., Aldamiz-Echevarría T., Muñoz-Fernández M.Á., & Resino, S. (2011). Sustained virological response to interferon- $\alpha$  plus ribavirin decreases inflammation and endothelial dysfunction markers in HIV/HCV co-infected patients. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(3), 645–649. <http://doi.org/10.1093/jac/dkq518>

Hadeiba, H., Sato, T., Habtezion, A., Oderup, C., Pan, J., & Butcher, E. C. (2008). CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nature Immunology*, 9(11), 1253–60. <http://doi.org/10.1038/ni.1658>

Hagemeyer, M. C., Rottier, P. J. M., & de Haan, C. A. M. (2012). Biogenesis and dynamics of the coronavirus replicative structures. *Viruses*, 4(11), 3245–69. <http://doi.org/10.3390/v4113245>

Haick, A. K., Rzepka, J. P., Brandon, E., Balemba, O. B., & Miura, T. A. (2014). Neutrophils are needed for an effective immune response against pulmonary rat coronavirus infection, but also contribute to pathology. *The Journal of General Virology*, 95(Pt 3), 578–90. <http://doi.org/10.1099/vir.0.061986-0>

Hamre, D., & Procknow, J. J. (1966). A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.), 121(1), 190–3.

Harris, H. E., & Raucchi, A. (2006). Alarmin(g) news about danger: workshop on innate danger signals and HMGB1. *EMBO Reports*, 7(8), 774–8. <http://doi.org/10.1038/sj.embor.7400759>

Hase, T., Dubois, D. R., & Summers, P. L. (1990). Comparative study of mouse brains infected with Japanese encephalitis virus by intracerebral or intraperitoneal inoculation. *International Journal of Experimental Pathology*, 71(6), 857–69.

Hasoksuz, M., Kayar, A., Dodurka, T., & Ilgaz, A. (2005). Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in Northwestern Turkey. *Acta Veterinaria Hungarica*, 53(1), 137–46. <http://doi.org/10.1556/AVet.53.2005.1.13>

Hatanpaa, K. J., & Kim, J. H. (2014). Neuropathology of viral infections. *Handbook of Clinical Neurology*, 123, 193–214. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-53488-0.00008-0>

Hawkins, B. T., & Davis, T. P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological Reviews*, 57(2), 173–85. <http://doi.org/10.1124/pr.57.2.4>

He, L., Ding, Y., Zhang, Q., Che, X., He, Y., Shen, H., Wang H., Li Z., Zhao L., Geng J., Deng Y., Yang L., Li J., Cai J., Qiu L., Wen K., Xu X., & Jiang, S. (2006). Expression of elevated levels of pro-inflammatory cytokines in SARS-CoV-infected ACE2+ cells in SARS patients: relation to the acute lung injury and pathogenesis of SARS. *The Journal of Pathology*, 210(3), 288–97. <http://doi.org/10.1002/path.2067>

Heaton, R. K., Clifford, D. B., Franklin, D. R., Woods, S. P., Ake, C., Vaida, F., Ellis R.J., Letendre S.L., Marcotte T.D., Atkinson J.H., Rivera-Mindt M., Vigil O.R., Taylor M.J., Collier A.C., Marra C.M., Gelman B.B., McArthur J.C., Morgello S., Simpson D.M., McCutchan J.A., Abramson I., Gamst A., Fennema-Notestine C., Jernigan T.L., Wong J., & Grant, I. (2010). HIV-associated neurocognitive disorders persist in the era of potent antiretroviral therapy: CHARTER Study. *Neurology*, 75(23), 2087–96. <http://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318200d727>

Heim, M. H., & Thimme, R. (2014). Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *Journal of Hepatology*, 61(1 Suppl), S14–25. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.06.035>

Hemmila, E., Turbide, C., Olson, M., Jothy, S., Holmes, K. V., & Beauchemin, N. (2004). Ceacam1a-/- mice are completely resistant to infection by murine coronavirus mouse hepatitis virus A59. *Journal of Virology*, 78(18), 10156–65. <http://doi.org/10.1128/JVI.78.18.10156-10165.2004>

Hoehme, S., Brulport, M., Bauer, A., Bedawy, E., Schormann, W., Hermes, M., Puppe V., Gebhardt R., Zellmer S., Schwarz M., Bockamp E., Timmel T., Hengstler J.G., & Drasdo, D. (2010). Prediction and validation of cell alignment along microvessels as order principle to restore tissue architecture in liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(23), 10371–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.0909374107>

Hoffmann, M., Zeisel, M. B., Jilg, N., Paranhos-Baccalà, G., Stoll-Keller, F., Wakita, T., Hafkemeyer P., Blum H.E., Barth H., Henneke P., & Baumert, T. F. (2009). Toll-like receptor 2 senses hepatitis C virus core protein but not infectious viral particles. *Journal of Innate Immunity*, 1(5), 446–54. <http://doi.org/10.1159/000226136>

Hollander, H., & Stringari, S. (1987). Human immunodeficiency virus-associated meningitis. *The American Journal of Medicine*, 83(5), 813–816. [http://doi.org/10.1016/0002-9343\(87\)90635-8](http://doi.org/10.1016/0002-9343(87)90635-8)

Holman, D. W., Klein, R. S., & Ransohoff, R. M. (2011). The blood-brain barrier, chemokines and multiple sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1812(2), 220–230. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.07.019>

Holub, M., Cheng, C.-W., Mott, S., Wintermeyer, P., van Rooijen, N., & Gregory, S. H. (2009). Neutrophils sequestered in the liver suppress the proinflammatory response of Kupffer cells to systemic bacterial infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(5), 3309–16. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0803041>

Homberger, F. R., Zhang, L., & Barthold, S. W. (1998). Prevalence of enterotropic and polytropic mouse hepatitis virus in enzootically infected mouse colonies. *Laboratory Animal Science*, 48(1), 50–4.

Hoofnagle, J. H. (2002). Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 36(5 Suppl 1), S21–9. <http://doi.org/10.1053/jhep.2002.36227>

Hoofnagle, J. H., Nelson, K. E., & Purcell, R. H. (2012). Hepatitis E. *The New England Journal of Medicine*, 367(13), 1237–44. <http://doi.org/10.1056/NEJMra1204512>

Horner, S. M. (2014). Activation and evasion of antiviral innate immunity by hepatitis C virus. *Journal of Molecular Biology*, 426(6), 1198–209. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.10.032>

Hösel, M., Broxtermann, M., Janicki, H., Esser, K., Arzberger, S., Hartmann, P., Gillen S., Kleeff J., Stabenow D., Odenthal M., Knolle P., Hallek M., Protzer U., & Büning, H. (2012). Toll-like receptor 2-mediated innate immune response in human nonparenchymal liver cells toward adeno-associated viral vectors. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 55(1), 287–97. <http://doi.org/10.1002/hep.24625>

Hösel, M., Quasdorff, M., Wiegmann, K., Webb, D., Zedler, U., Broxtermann, M., Tedjokusumo R., Esser K., Arzberger S., Kirschning C.J., Langenkamp A., Falk C., Büning H., Rose-John S., & Protzer, U. (2009). Not interferon, but interleukin-6 controls early gene expression in hepatitis B virus infection. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 50(6), 1773–82. <http://doi.org/10.1002/hep.23226>

Hsieh, M. J., White, P. J., & Pouton, C. W. (2010). Interaction of viruses with host cell molecular motors. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(5), 633–9. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.06.009>

Hsu, W., Shu, S.-A., Gershwin, E., & Lian, Z.-X. (2007). The current immune function of hepatic dendritic cells. *Cellular & Molecular Immunology*, 4(5), 321–8.

Hu, X., Chen, J., Wang, L., & Ivashkiv, L. B. (2007). Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(2), 237–43. <http://doi.org/10.1189/jlb.1206763>

Huang, Z., Ge, J., Pang, J., Liu, H., Chen, J., Liao, B., Huang X., Zuo D., Sun J., Lu M., Zhang X., & Hou, J. (2015). Aberrant expression and dysfunction of TLR2 and its soluble form in chronic HBV infection and its regulation by antiviral therapy. *Antiviral Research*, 118, 10–9. <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.004>

Iacono, K. T., Kazi, L., & Weiss, S. R. (2006). Both spike and background genes contribute to murine coronavirus neurovirulence. *Journal of Virology*, 80(14), 6834–43. <http://doi.org/10.1128/JVI.00432-06>

Imran, M., Waheed, Y., Manzoor, S., Bilal, M., Ashraf, W., Ali, M., & Ashraf, M. (2012). Interaction of Hepatitis C virus proteins with pattern recognition receptors *Virology*, 9, 126. <http://doi:10.1186/1743-422X-9-126>

- Ireland, D. D. C., Stohlman, S. A., Hinton, D. R., Atkinson, R., & Bergmann, C. C. (2008). Type I interferons are essential in controlling neurotropic coronavirus infection irrespective of functional CD8 T cells. *Journal of Virology*, 82(1), 300–10. <http://doi.org/10.1128/JVI.01794-07>
- Ishibashi, H., Nakamura, M., Komori, A., Migita, K., & Shimoda, S. (2009). Liver architecture, cell function, and disease. *Seminars in Immunopathology*, 31(3), 399–409. <http://doi.org/10.1007/s00281-009-0155-6>
- Isogawa, M., Robek, M. D., Furuichi, Y., & Chisari, F. V. (2005). Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *Journal of Virology*, 79(11), 7269–72. <http://doi.org/10.1128/JVI.79.11.7269-7272.2005>
- Jackson, A. C. (2015). Diabolical effects of rabies encephalitis. *Journal of Neurovirology*. <http://doi.org/10.1007/s13365-015-0351-1>
- Jacques, A., Bleau, C., Martin, J. P., & Lamontagne, L. (2008). Intrahepatic endothelial and Kupffer cells involved in immunosuppressive cytokines and natural killer (NK)/NK T cell disorders in viral acute hepatitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 152(2), 298–310.
- Jacques, A., Bleau, C., Turbide, C., Beauchemin, N., & Lamontagne, L. (2009a). A synergistic interferon-gamma production is induced by mouse hepatitis virus in interleukin-12 (IL-12)/IL-18-activated natural killer cells and modulated by carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAM) 1a receptor. *Immunology*, 128(1 Suppl), e551–e561.
- Jacques, A., Bleau, C., Turbide, C., Beauchemin, N., & Lamontagne, L. (2009b). Macrophage interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha are induced by coronavirus fixation to Toll-like receptor 2/heparan sulphate receptors but not carcinoembryonic cell adhesion antigen 1a. *Immunology*, 128, e181-192.
- Janicko, M., Veselíny, E., Leško, D., Jarcuška, P. (2013). Serum cholesterol is a significant and independent mortality predictor in liver cirrhosis patients. *Ann Hepatol.*, 12, 581-7.
- Jiménez, A. J., Domínguez-Pinos, M.-D., Guerra, M. M., Fernández-Llebrez, P., & Pérez-Fígares, J.-M. (2014). Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Tissue Barriers*, 2, e28426. <http://doi.org/10.4161/tisb.28426>
- Jolicoeur, P., & Lamontagne, L. (1989). Mouse hepatitis virus 3 pathogenicity expressed by a lytic viral infection in bone marrow 14.8+ mu+ B lymphocyte subpopulations. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 143(11), 3722–30.
- Jolicoeur, P., & Lamontagne, L. (1994). Impaired T and B cell subpopulations involved in a chronic disease induced by mouse hepatitis virus type 3. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 153(3), 1318–7.

Joseph, J., Kim, R., Siebert, K., Lublin, F. D., Offenbach, C., & Knobler, R. L. (1995). Organ specific endothelial cell heterogeneity influences differential replication and cytopathogenicity of MHV-3 and MHV-4. Implications in viral tropism. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 380, 43–50.

Kadowaki, S., Meguro, S., Imaizumi, Y., Sakai, H., Endoh, D., & Hayashi, M. (2013). Role of p38 Mapk in development of acute hepatic injury in Long-Evans Cinnamon (LEC) rats, an animal model of human Wilson's disease. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 75(12), 1551–6.

Kakalacheva, K., Münz, C., & Lünemann, J. D. (2011). Viral triggers of multiple sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812(2), 132–40. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.06.012>

Kammerer, R., Hahn, S., Singer, B. B., Luo, J. S., & von Kleist, S. (1998). Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: structure, expression and involvement in T cell activation. *European Journal of Immunology*, 28(11), 3664–74. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199811\)28:11<3664::AID-IMMU3664>3.0.CO;2-D](http://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199811)28:11<3664::AID-IMMU3664>3.0.CO;2-D)

Kammerer, R., Stober, D., Singer, B. B., Obrink, B., & Reimann, J. (2001). Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 on murine dendritic cells is a potent regulator of T cell stimulation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(11), 6537–44.

Kamoun, W. S., Karaa, A., Kresge, N., Merkel, S. M., Korneszczyk, K., & Clemens, M. G. (2006). LPS inhibits endothelin-1-induced endothelial NOS activation in hepatic sinusoidal cells through a negative feedback involving caveolin-1. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 43(1), 182–90. <http://doi.org/10.1002/hep.20940>

Kang, S. S., & McGavern, D. B. (2008). Lymphocytic choriomeningitis infection of the central nervous system. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 13, 4529–43.

Kang, Y. J., Chen, J., Otsuka, M., Mols, J., Ren, S., Wang, Y., & Han, J. (2008). Macrophage deletion of p38alpha partially impairs lipopolysaccharide-induced cellular activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(7), 5075–82.

Karlmark, K. R., Wasmuth, H. E., Trautwein, C., & Tacke, F. (2008). Chemokine-directed immune cell infiltration in acute and chronic liver disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 2(2), 233–42. <http://doi.org/10.1586/17474124.2.2.233>

Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura T., Takeda K., Fujita T., Takeuchi O., & Akira, S. (2005). Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity*, 23(1), 19–28. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.04.010>



Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi A., Dermody T.S., Fujita T., & Akira, S. (2008). Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(7), 1601–10. <http://doi.org/10.1084/jem.20080091>

Kaul, M., Garden, G. A., & Lipton, S. A. (2001). Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature*, 410(6831), 988–94. <http://doi.org/10.1038/35073667>

Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii K.J., Takeuchi O., & Akira, S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nature Immunology*, 6(10), 981–8. <http://doi.org/10.1038/ni1243>

Kern, M., Popov, A., Scholz, K., Schumak, B., Djandji, D., Limmer, A., Eggle D., Sacher T., Zawatzky R., Holtappels R., Reddehase M.J., Hartmann G., Debey-Pascher S., Diehl L., Kalinke U., Koszinowski U., Schultze J., & Knolle, P. A. (2010). Virally infected mouse liver endothelial cells trigger CD8+ T-cell immunity. *Gastroenterology*, 138(1), 336–46. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.08.057>

Khakoo, S. I., Thio, C. L., Martin, M. P., Brooks, C. R., Gao, X., Astemborski, J., ... Carrington, M. (2004). HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5685), 872–4. <http://doi.org/10.1126/science.1097670>

Kieseier, B. C. (2011). The mechanism of action of interferon- $\beta$  in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs*, 25(6), 491–502. <http://doi.org/10.2165/11591110-000000000-00000>

Kim, C., Sano, Y., Todorova, K., Carlson, B. A., Arpa, L., Celada, A., Lawrence T., Otsu K., Brissette J.L., Arthur J.S., & Park, J. M. (2008). The kinase p38 alpha serves cell type-specific inflammatory functions in skin injury and coordinates pro- and anti-inflammatory gene expression. *Nature Immunology*, 9(9), 1019–27. <http://doi.org/10.1038/ni.1640>

Kim, J. V., Kang, S. S., Dustin, M. L., & McGavern, D. B. (2008). Myelomonocytic cell recruitment causes fatal CNS vascular injury during acute viral meningitis. *Nature*, 457(7226), 191–195. <http://doi.org/10.1038/nature07591>

King, Andrew M.Q. , Adams, Michael J. , Carstens, Eric B. , Lefkowitz, E. J. (2012). Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.

Klein, R. S., Lin, E., Zhang, B., Luster, A. D., Tollett, J., Samuel, M. A., Engle M., & Diamond, M. S. (2005). Neuronal CXCL10 directs CD8+ T-cell recruitment and control of West Nile virus encephalitis. *Journal of Virology*, 79(17), 11457–66. <http://doi.org/10.1128/JVI.79.17.11457-11466.2005>

Klugewitz, K., Adams, D. H., Emoto, M., Eulenburg, K., & Hamann, A. (2004a). The composition of intrahepatic lymphocytes: shaped by selective recruitment? *Trends in Immunology*, 25(11), 590–4. <http://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.006>

Klugewitz, K., Blumenthal-Barby, F., Eulenburg, K., Emoto, M., & Hamann, A. (2004b). The spectrum of lymphoid subsets preferentially recruited into the liver reflects that of resident populations. *Immunology Letters*, 93(2-3), 159–62. <http://doi.org/10.1016/j.imlet.2004.03.007>

Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2007). *Fields virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

Knolle, P. A., Germann, T., Treichel, U., Uhrig, A., Schmitt, E., Hegenbarth, S., Lohse A.W., & Gerken, G. (1999). Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 162(3), 1401–7.

Knolle, P. A., & Thimme, R. (2014). Hepatic immune regulation and its involvement in viral hepatitis infection. *Gastroenterology*, 146(5), 1193–1207. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.12.036>

Knolle, P. A., & Thimme, R. (2014). Hepatic immune regulation and its involvement in viral hepatitis infection. *Gastroenterology*, 146(5), 1193–207. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.12.036>

Knolle, P. A., Uhrig, A., Hegenbarth, S., Löser, E., Schmitt, E., Gerken, G., & Lohse, A. W. (1998). IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules. *Clinical and Experimental Immunology*, 114(3), 427–33.

Knolle, P., Schlaak, J., Uhrig, A., Kempf, P., Meyer zum Büschenfelde, K. H., & Gerken, G. (1995). Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *Journal of Hepatology*, 22(2), 226–9.

Kobiler, D., Lustig, S., Gozes, Y., Ben-Nathan, D., & Akov, Y. (1989). Sodium dodecylsulphate induces a breach in the blood-brain barrier and enables a West Nile virus variant to penetrate into mouse brain. *Brain Research*, 496(1-2), 314–6.

Koch, S.D., Uss, E., van Lier, R.A., & ten Berge, I.J. (2008). Alloantigen-induced regulatory CD8+CD103+ T cells. *Hum Immunol*, 69(11), 737–44. <http://doi: 10.1016/j.humimm.2008.08.281>.

Kondo, Y., Ninomiya, M., Kimura, O., Machida, K., Funayama, R., Nagashima, T., Kobayashi K., Kakazu E., Kato T., Nakayama K., Lai M.M., & Shimosegawa, T. (2014). HCV infection enhances Th17 commitment, which could affect the pathogenesis of autoimmune diseases. *PloS One*, 9(6), e98521. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0098521>

Kowalewska, P. M., Patrick, A. L., & Fox-Robichaud, A. E. (2011). Innate immunity of the liver microcirculation. *Cell and Tissue Research*, 343(1), 85–96. <http://doi.org/10.1007/s00441-010-1058-5>

Kraus, J., Ling, A. K., Hamm, S., Voigt, K., Oschmann, P., & Engelhardt, B. (2004). Interferon- $\beta$  stabilizes barrier characteristics of brain endothelial cells in vitro. *Annals of Neurology*, 56(2), 192–205. <http://doi.org/10.1002/ana.20161>

Krueger, D. K., Kelly, S. M., Lewicki, D. N., Ruffolo, R., & Gallagher, T. M. (2001). Variations in disparate regions of the murine coronavirus spike protein impact the initiation of membrane fusion. *Journal of Virology*, 75(6), 2792–802. <http://doi.org/10.1128/JVI.75.6.2792-2802.2001>

Kruse, N., Neumann, K., Schrage, A., Derkow, K., Schott, E., Erben, U., Kühl A., Loddenkemper C., Zeitz M, Hamann A., & Klugewitz, K. (2009). Priming of CD4<sup>+</sup> T cells by liver sinusoidal endothelial cells induces CD25<sup>low</sup> forkhead box protein 3- regulatory T cells suppressing autoimmune hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50(6), 1904–13. <http://doi.org/10.1002/hep.23191>

Kumar, M., Verma, S., & Nerurkar, V. R. (2010). Pro-inflammatory cytokines derived from West Nile virus (WNV)-infected SK-N-SH cells mediate neuroinflammatory markers and neuronal death. *Journal of Neuroinflammation*, 7, 73. <http://doi.org/10.1186/1742-2094-7-73>

Kuo, L., & Masters, P. S. (2003). The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication. *Journal of Virology*, 77(8), 4597–608.

Kuo, R.-L., Kung, S.-H., Hsu, Y.-Y., & Liu, W.-T. (2002). Infection with enterovirus 71 or expression of its 2A protease induces apoptotic cell death. *The Journal of General Virology*, 83(Pt 6), 1367–76.

Kuroki, M., Matsuo, Y., Kinugasa, T., & Matsuoka, Y. (1992). Augmented expression and release of nonspecific cross-reacting antigens (NCAs), members of the CEA family, by human neutrophils during cell activation. *Journal of Leukocyte Biology*, 52(5), 551–7.

Kurt-Jones, E. A., Chan, M., Zhou, S., Wang, J., Reed, G., Bronson, R., Arnold M.M., Knipe D.M., & Finberg, R. W. (2004). Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(5), 1315–20. <http://doi.org/10.1073/pnas.0308057100>

Kwok, W., Lee, S. H., Culberson, C., Korneszczyk, K., & Clemens, M. G. (2009). Caveolin-1 mediates endotoxin inhibition of endothelin-1-induced endothelial nitric oxide synthase activity in liver sinusoidal endothelial cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 297(5), G930–G939. <http://doi.org/10.1152/ajpgi.00106.2009>

Lamontagne, L., Decarie, D., & Dupuy, J. M. (1989a). Host cell resistance to mouse hepatitis virus type 3 is expressed in vitro in macrophages and lymphocytes. *Viral Immunology*, 2(1), 37–45.

Lamontagne, L., Descoteaux, J. P., & Jolicoeur, P. (1989b). Mouse hepatitis virus 3 replication in T and B lymphocytes correlate with viral pathogenicity. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 142(12), 4458–65.

Lamontagne, L., & Dupuy, J. M. (1987). Characterization of a non-pathogenic MHV3 variant derived from a persistently infected lymphoid cell line. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 218, 255–63.

Lamontagne, L., & Jolicoeur, P. (1991). Mouse hepatitis virus 3-thymic cell interactions correlating with viral pathogenicity. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 146(9), 3152–9.

Lamontagne, L., Jolicoeur, P., Decarie, D., & Menezes, J. (1996). Effect of adoptive transfer of CD4, CD8 and B cells on recovery from MHV3-induced immunodeficiencies. *Immunology*, 88(2), 220–9.

Lamontagne, L., Lusignan, S., & Page, C. (2001). Recovery from mouse hepatitis virus infection depends on recruitment of CD8(+) cells rather than activation of intrahepatic CD4(+)alpha-beta(-)TCR(inter) or NK-T cells. *Clinical Immunology* (Orlando, Fla.), 101(3), 345–56. <http://doi.org/10.1006/clim.2001.5131>

Lamontagne, L. M., & Dupuy, J. M. (1984). Persistent infection with mouse hepatitis virus 3 in mouse lymphoid cell lines. *Infection and Immunity*, 44(3), 716–23.

Lamontagne, L., Massicotte, E., & Page, C. (1997). Mouse hepatitis viral infection induces an extrathymic differentiation of the specific intrahepatic alpha beta-TCRintermediate LFA-1high T-cell population. *Immunology*, 90(3), 402–11.

Lamontagne, L., Pagé, C., Braunwald, J., & Martin, J. P. (1994). Pathogenicity of neutralization escape mutants of mouse hepatitis virus: correlation with T- and B-cell depletions. *Research in Immunology*, 145(7), 553–65.

Lampron, A., Elali, A., & Rivest, S. (2013). Innate immunity in the CNS: redefining the relationship between the CNS and Its environment. *Neuron*, 78(2), 214–32. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.04.005>

Lan, R. Y. Z., Salunga, T. L., Tsuneyama, K., Lian, Z.-X., Yang, G.-X., Hsu, W., Moritoki Y., Ansari A.A., Kemper C., Price J., Atkinson J.P., Coppel R.L., & Gershwin, M. E. (2009). Hepatic IL-17 responses in human and murine primary biliary cirrhosis. *Journal of Autoimmunity*, 32(1), 43–51. <http://doi.org/10.1016/j.jaut.2008.11.001>

Lane, T. E., Asensio, V. C., Yu, N., Paoletti, A. D., Campbell, I. L., & Buchmeier, M. J. (1998). Dynamic regulation of alpha- and beta-chemokine expression in the central nervous system during mouse hepatitis virus-induced demyelinating disease. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 160(2), 970–8.

Lane, T. E., & Hosking, M. P. (2010). The pathogenesis of murine coronavirus infection of the central nervous system. *Critical Reviews in Immunology*, 30(2), 119–30.

Larochelle, C., Alvarez, J. I., & Prat, A. (2011). How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Letters*, 585(23), 3770–80. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.066>

Latz, E., Verma, A., Visintin, A., Gong, M., Sirois, C. M., Klein, D. C. G., Monks B.G., McKnight C.J., Lamphier M.S., Duprex W.P., Espevik T., & Golenbock, D. T. (2007). Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nature Immunology*, 8(7), 772–9. <http://doi.org/10.1038/ni1479>

Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., Li, K. S. M., Huang, Y., Tsoi, H.-W., Wong, B. H. L., Wong S.S., Leung S.Y., Chan K.H., & Yuen, K.-Y. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 14040–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.0506735102>

Lavanchy, D. (2009). The global burden of hepatitis C. *Liver International : Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 29 Suppl 1, 74–81. <http://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2008.01934.x>

Lavi, E., Das Sarma, J., & Weiss, S. R. (1999). Cellular reservoirs for coronavirus infection of the brain in beta2-microglobulin knockout mice. *Pathobiology : Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology*, 67(2), 75–83. <http://doi.org/28054>

Lavi, E., Gilden, D. H., Highkin, M. K., & Weiss, S. R. (1986). The organ tropism of mouse hepatitis virus A59 in mice is dependent on dose and route of inoculation. *Laboratory Animal Science*, 36(2), 130–5.

Lavi, E., Gilden, D. H., Wroblewska, Z., Rorke, L. B., & Weiss, S. R. (1984). Experimental demyelination produced by the A59 strain of mouse hepatitis virus. *Neurology*, 34(5), 597–603.

Lavi, E., Suzumura, A., Hirayama, M., Highkin, M. K., Dambach, D. M., Silberberg, D. H., & Weiss, S. R. (1987). Coronavirus mouse hepatitis virus (MHV)-A59 causes a persistent, productive infection in primary glial cell cultures. *Microbial Pathogenesis*, 3(2), 79–86.

Le Prevost, C., Levy-Leblond, E., Virelizier, J. L., & Dupuy, J. M. (1975). Immunopathology of mouse hepatitis virus type 3 infection. Role of humoral and cell-mediated immunity in resistance mechanisms. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 114(1 Pt 1), 221–5.

Lee, W. M. (1997). Hepatitis B virus infection. *The New England Journal of Medicine*, 337(24), 1733–45. <http://doi.org/10.1056/NEJM199712113372406>

Lehoux, M., Jacques, A., Lusignan, S., & Lamontagne, L. (2004). Murine viral hepatitis involves NK cell depletion associated with virus-induced apoptosis. *Clinical and Experimental Immunology*, 137(1), 41–51. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02501.x>

Leifeld, L., Dumoulin, F.-L., Purr, I., Janberg, K., Trautwein, C., Wolff, M., Manns M.P., Sauerbruch T., & Spengler, U. (2003). Early up-regulation of chemokine expression in fulminant hepatic failure. *The Journal of Pathology*, 199(3), 335–44. <http://doi.org/10.1002/path.1298>

Leis, A. A., Fratkin, J., Stokic, D. S., Harrington, T., Webb, R. M., & Slavinski, S. A. (2003). West Nile poliomyelitis. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(1), 9–10. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00478-X](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00478-X)

Lemon, S. M., Binn, L. N., Marchwicki, R., Murphy, P. C., Ping, L. H., Jansen, R. W., Asher L.V., Stapleton J.T., Taylor D.G., & LeDuc, J. W. (1990). In vivo replication and reversion to wild type of a neutralization-resistant antigenic variant of hepatitis A virus. *The Journal of Infectious Diseases*, 161(1), 7–13.

Leray, D., Dupuy, C., & Dupuy, J. M. (1982). Immunopathology of mouse hepatitis virus type 3 infection. IV. MHV3-induced immunodepression. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 23(2), 539–47.

Levy, G. A., MacPhee, P. J., Fung, L. S., Fisher, M. M., & Rappaport, A. M. (1983). The effect of mouse hepatitis virus infection on the microcirculation of the liver. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 3(6), 964–73.

Levy, G., & Abecassis, M. (1989). Activation of the immune coagulation system by murine hepatitis virus strain 3. *Reviews of Infectious Diseases*, 11 Suppl 4, S712–21.

Li, F. (2015). Receptor recognition mechanisms of coronaviruses: a decade of structural studies. *Journal of Virology*, 89(4), 1954–64. <http://doi.org/10.1128/JVI.02615-14>

Li, J., Liu, Y., & Zhang, X. (2010). Murine coronavirus induces type I interferon in oligodendrocytes through recognition by RIG-I and MDA5. *Journal of Virology*, 84(13), 6472–82. <http://doi.org/10.1128/JVI.00016-10>

Li, J., Wang, Y., Wang, X., Ye, L., Zhou, Y., Persidsky, Y., & Ho, W. (2013). Immune activation of human brain microvascular endothelial cells inhibits HIV replication in macrophages. *Blood*, 121(15), 2934–42. <http://doi.org/10.1182/blood-2012-08-450353>

Li, K., Foy, E., Ferreon, J. C., Nakamura, M., Ferreon, A. C. M., Ikeda, M., Ray S.C., Gale M. Jr, & Lemon, S. M. (2005). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(8), 2992–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.0408824102>

Li, K., Li, N. L., Wei, D., Pfeffer, S. R., Fan, M., & Pfeffer, L. M. (2012). Activation of chemokine and inflammatory cytokine response in hepatitis C virus-infected hepatocytes depends on Toll-like receptor 3 sensing of hepatitis C virus double-stranded RNA intermediates. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 55(3), 666–75. <http://doi.org/10.1002/hep.24763>

Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J. H., Wang H., Cramer G., Hu Z., Zhang H., Zhang J., McEachern J., Field H., Daszak P., Eaton B.T., Zhang S., & Wang, L.-F. (2005). Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5748), 676–9. <http://doi.org/10.1126/science.1118391>

Li, W., Sui, J., Huang, I.-C., Kuhn, J. H., Radoshitzky, S. R., Marasco, W. A., Choe, H., & Farzan, M. (2007). The S proteins of human coronavirus NL63 and severe acute respiratory syndrome coronavirus bind overlapping regions of ACE2. *Virology*, 367(2), 367–74. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2007.04.035>

Li, W., Wong, S.-K., Li, F., Kuhn, J. H., Huang, I.-C., Choe, H., & Farzan, M. (2006). Animal origins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus: insight from ACE2-S-protein interactions. *Journal of Virology*, 80(9), 4211–9. <http://doi.org/10.1128/JVI.80.9.4211-4219.2006>

Li, Y.J., Zhu, P., Liang, Y., Yin, W.G., Xiao, J.H. (2013). Hepatitis B virus induces expression of cholesterol metabolism-related genes via TLR2 in HepG2 cells. *World J Gastroenterol*, 19, 2262-9.

Lian, Z.-X., Okada, T., He, X.-S., Kita, H., Liu, Y.-J., Ansari, A. A., Kikuchi K., Ikehara S., & Gershwin, M. E. (2003). Heterogeneity of dendritic cells in the mouse liver: identification and characterization of four distinct populations. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(5), 2323–30.

Liang, B., Chen, R., Wang, T., Cao, L., Liu, Y., & Yin, F. (2013) Myeloid differentiation factor 88 promotes growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.*, 19, 2905-16.

Liaskou, E., Wilson, D. V., & Oo, Y. H. (2012). Innate immune cells in liver inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/949157>

- Liew, F. Y. (2002). T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nature Reviews. Immunology*, 2(1), 55–60. <http://doi.org/10.1038/nri705>
- Liew, F. Y., Pitman, N. I., & McInnes, I. B. (2010). Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nature Reviews. Immunology*, 10(2), 103–10. <http://doi.org/10.1038/nri2692>
- Lin, M. T., Hinton, D. R., Marten, N. W., Bergmann, C. C., & Stohlman, S. A. (1999). Antibody prevents virus reactivation within the central nervous system. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(12), 7358–68.
- 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 cytotoxicity. *Journal of Virology*, 71(1), 383–91.
- Lissenberg, A., Vrolijk, M. M., van Vliet, A. L. W., Langereis, M. A., de Groot-Mijnes, J. D. F., Rottier, P. J. M., & de Groot, R. J. (2005). Luxury at a cost? Recombinant mouse hepatitis viruses expressing the accessory hemagglutinin esterase protein display reduced fitness in vitro. *Journal of Virology*, 79(24), 15054–63. <http://doi.org/10.1128/JVI.79.24.15054-15063.2005>
- Liu, J., Jiang, M., Ma, Z., Dietze, K. K., Zelinskyy, G., Yang, D., Dittmer U., Schlaak J.F., Roggendorf M., & Lu, M. (2013). TLR1/2 Ligand-Stimulated Mouse Liver Endothelial Cells Secrete IL-12 and Trigger CD8+ T Cell Immunity In Vitro. *Journal of Immunology*, 191(12), 6178–90. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1301262>
- Liu, J., Tan, Y., Zhang, J., Zou, L., Deng, G., Xu, X., Wang F., Ma Z., Zhang J., Zhao T., Liu Y., Li Y., Zhu B., & Guo, B. (2015). C5aR, TNF- $\alpha$ , and FGL2 contribute to coagulation and complement activation in virus-induced fulminant hepatitis. *Journal of Hepatology*, 62(2), 354–62. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.08.050>
- Liu, M., Chan, C. W. Y., McGilvray, I., Ning, Q., & Levy, G. A. (2001). Fulminant viral hepatitis: molecular and cellular basis, and clinical implications. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 3(10), 1–19. <http://doi.org/10.1017/S1462399401002812>
- Liu, Y. J., Kanzler, H., Soumelis, V., & Gilliet, M. (2001). Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nature Immunology*, 2(7), 585–9. <http://doi.org/10.1038/89726>
- Loo, Y.-M., & Gale, M. (2011). Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity*, 34(5), 680–92. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.003>
- Löscher, W., & Potschka, H. (2005). Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nature Reviews. Neuroscience*, 6(8), 591–602. <http://doi.org/10.1038/nrn1728>



Lu, G., Hu, Y., Wang, Q., Qi, J., Gao, F., Li, Y., Zhang Y., Zhang W., Yuan Y., Bao J., Zhang B., Shi Y., Yan J., & Gao, G. F. (2013). Molecular basis of binding between novel human coronavirus MERS-CoV and its receptor CD26. *Nature*, 500(7461), 227–31. <http://doi.org/10.1038/nature12328>

Lu, X., Xu, Q., Bu, X., Ma, X., Zhang, F., Deng, Q, Zhang, Y., & Ding, J. (2014). Relationship between expression of toll-like receptors 2/4 in dendritic cells and chronic hepatitis B virus infection. *Int J Clin Exp Pathol.*, 7(9), 6048-55.

Ludwig, I. S., Lekkerkerker, A. N., Depla, E., Bosman, F., Musters, R. J. P., Depraetere, S., van Kooyk Y., & Geijtenbeek, T. B. H. (2004). Hepatitis C virus targets DC-SIGN and L-SIGN to escape lysosomal degradation. *Journal of Virology*, 78(15), 8322–32. <http://doi.org/10.1128/JVI.78.15.8322-8332.2004>

Lustig, S., Danenberg, H. D., Kafri, Y., Kobiler, D., & Ben-Nathan, D. (1992). Viral neuroinvasion and encephalitis induced by lipopolysaccharide and its mediators. *The Journal of Experimental Medicine*, 176(3), 707–12.

MacPhee, P. J., Dindzans, V. J., Fung, L. S., & Levy, G. A. (1985). Acute and chronic changes in the microcirculation of the liver in inbred strains of mice following infection with mouse hepatitis virus type 3. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 5(4), 649–60.

MacPhee, P. J., Schmidt, E. E., Keown, P. A., & Groom, A. C. (1988). Microcirculatory changes in livers of mice infected with murine hepatitis virus. Evidence from microcorrosion casts and measurements of red cell velocity. *Microvascular Research*, 36(2), 140–9.

Maeda, S. (2010). NF- $\kappa$ B, JNK, and TLR signaling pathways in hepatocarcinogenesis. *Gastroenterol Res Pract*, 2010, 367694.

Manigold, T., & Racanelli, V. (2007). T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies. *The Lancet. Infectious Diseases*, 7(12), 804–13. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70289-X](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70289-X)

Markel, G., Gruda, R., Achdout, H., Katz, G., Nechama, M., Blumberg, R. S., Kammerer R., Zimmermann W., & Mandelboim, O. (2004). The critical role of residues 43R and 44Q of carcinoembryonic antigen cell adhesion molecules-1 in the protection from killing by human NK cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(6), 3732–9.

Marsden, P. A., Ning, Q., Fung, L. S., Luo, X., Chen, Y., Mendicino, M., Ghanekar A., Scott J.A., Miller T., Chan C.W., Chan M.W., He W., Gorczynski R.M., Grant D.R., Clark D.A., Phillips M.J., & Levy, G. A. (2003). The Fgl2/fibroleukin prothrombinase contributes to immunologically mediated thrombosis in experimental and human viral hepatitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(1), 58–66. <http://doi.org/10.1172/JCI18114>

- 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), 7903–10.
- Marten, N. W., Stohlman, S. A., Zhou, J., & Bergmann, C. C. (2003). Kinetics of virus-specific CD8+ -T-cell expansion and trafficking following central nervous system infection. *Journal of Virology*, 77(4), 2775–8.
- Martin, F., & Kearney, J. F. (2000). Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk. *Immunity*, 12(1), 39–49.
- Martin, J. P., Chen, W., Koehren, F., & Pereira, C. A. (1994). The virulence of mouse hepatitis virus 3, as evidenced by permissivity of cultured hepatic cells toward escape mutants. *Research in Virology*, 145(5), 297–302.
- Martinez, J., Huang, X., & Yang, Y. (2010). Direct TLR2 signaling is critical for NK cell activation and function in response to vaccinia viral infection. *PLoS Pathogens*, 6(3), e1000811. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000811>
- Marvie, P., Lisbonne, M., L'helgoualc'h, A., Rauch, M., Turlin, B., Preisser, L., Bourd-Boittin K., Théret N., Gascan H., Piquet-Pellorce C., & Samson, M. (2010). Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(6B), 1726–39. <http://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00801.x>
- Mata, M., Zhang, M., Hu, X., & Fink, D. J. (2001). HveC (nectin-1) is expressed at high levels in sensory neurons, but not in motor neurons, of the rat peripheral nervous system. *Journal of Neurovirology*, 7(5), 476–80. <http://doi.org/10.1080/135502801753170336>
- Matsumura, T., Ito, A., Takii, T., Hayashi, H., & Onozaki, K. (2000). Endotoxin and cytokine regulation of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 gene expression in murine liver and hepatocytes. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 20(10), 915–21. <http://doi.org/10.1089/10799900050163299>
- Matsuyama, S., & Taguchi, F. (2002). Receptor-induced conformational changes of murine coronavirus spike protein. *Journal of Virology*, 76(23), 11819–26.
- Matsuzaki, K., Murata, M., Yoshida, K., Sekimoto, G., Uemura, Y., & Sakaida, N. (2007). Chronic inflammation associated with hepatitis C virus infection perturbs hepatic transforming growth factor b signaling, promoting cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 46, 48-57.
- Matthews, A. E., Lavi, E., Weiss, S. R., & Paterson, Y. (2002). Neither B cells nor T cells are required for CNS demyelination in mice persistently infected with MHV-A59. *Journal of Neurovirology*, 8(3), 257–264. <http://doi.org/10.1080/13550280290049697>

Matthews, A. E., Weiss, S. R., Shlomchik, M. J., Hannum, L. G., Gombold, J. L., & Paterson, Y. (2001). Antibody is required for clearance of infectious murine hepatitis virus A59 from the central nervous system, but not the liver. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(9), 5254–63.

Mazaleuskaya, L., Veltrop, R., Ikpeze, N., Martin-Garcia, J., & Navas-Martin, S. (2012). Protective role of Toll-like Receptor 3-induced type I interferon in murine coronavirus infection of macrophages. *Viruses*, 4(5), 901–23. <http://doi.org/10.3390/v4050901>

McBride, R., van Zyl, M., & Fielding, B. C. (2014). The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses*, 6(8), 2991–3018. <http://doi.org/10.3390/v6082991>

McGavern, D. B., & Kang, S. S. (2011). Illuminating viral infections in the nervous system. *Nature Reviews. Immunology*, 11(5), 318–329. <http://doi.org/10.1038/nri2971>

McGuinness, P.H., Dainter, D., Davies, S., & McCaughan, G.W. (2000). Increases in hepatic CD68 positive cells, and proinflammatory cytokines (particularly interleukin 18) in chronic hepatitis C infection. *Gut*, 46, 260-9.

McIntosh, K., Becker, W. B., & Chanock, R. M. (1967). Growth in suckling-mouse brain of “IBV-like” viruses from patients with upper respiratory tract disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 58(6), 2268–73.

McIntosh, K., Dees, J. H., Becker, W. B., Kapikian, A. Z., & Chanock, R. M. (1967). Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 57(4), 933–40.

Melchjorsen, J. (2013). Learning from the messengers: innate sensing of viruses and cytokine regulation of immunity - clues for treatments and vaccines. *Viruses*, 5(2), 470–527. <http://doi.org/10.3390/v5020470>

Mello, I. G., Vassão, R. C., & Pereira, C. A. (1993). Virus specificity of the antiviral state induced by IFN gamma correlates with resistance to MHV 3 infection. *Archives of Virology*, 132(3-4), 281–9.

Mencin, A., Kluwe, J., & Schwabe, R. F. (2009). Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. *Gut*, 58(5), 704–20. <http://doi.org/10.1136/gut.2008.156307>

Meng, Y., He, S., Liu, Q., Xu, D., Zhang, T., & Chen, Z. (2015). High prevalence of hepatitis B virus infection in primary central nervous system lymphoma. *Int J Clin Exp Med.*, 8(6), 9937–9942.

Michos, A. G., Syriopoulou, V. P., Hadjichristodoulou, C., Daikos, G. L., Lagona, E., Douridas, P., Mostrou G., & Theodoridou, M. (2007). Aseptic meningitis in children: analysis of 506 cases. *PloS One*, 2(7), e674. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0000674>

Mineta, K., Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., Tamura A., Igarashi M., Endo T., Takeuchi K., & Tsukita, S. (2011). Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Letters*, 585(4), 606–12. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.01.028>

Miura, T. A., Travanty, E. A., Oko, L., Bielefeldt-Ohmann, H., Weiss, S. R., Beauchemin, N., & Holmes, K. V. (2008). The spike glycoprotein of murine coronavirus MHV-JHM mediates receptor-independent infection and spread in the central nervous systems of Ceacam1a-/- Mice. *Journal of Virology*, 82(2), 755–63. <http://doi.org/10.1128/JVI.01851-07>

Miyake, K. (2007). Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Seminars in Immunology*, 19(1), 3–10. <http://doi.org/10.1016/j.smim.2006.12.002>

Moles, A., Murphy, L., Wilson, C. L., Chakraborty, J. B., Fox, C., Park, E. J., Mann J., Oakley F., Howarth R., Brain J., Masson S., Karin M., Seki E., & Mann, D. A. (2014). A TLR2/S100A9/CXCL-2 signaling network is necessary for neutrophil recruitment in acute and chronic liver injury in the mouse. *Journal of Hepatology*, 60(4), 782–91. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.12.005>

Moller, M. J., Kammerer, R., Grunert, F., & von Kleist, S. (1996). Biliary glycoprotein (BGP) expression on T cells and on a natural-killer-cell sub-population. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 65(6), 740–5. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19960315\)65:6<740::AID-IJC5>3.0.CO;2-Z](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19960315)65:6<740::AID-IJC5>3.0.CO;2-Z)

Mori, I., Nishiyama, Y., Yokochi, T., & Kimura, Y. (2005). Olfactory transmission of neurotropic viruses. *Journal of Neurovirology*, 11(2), 129–37. <http://doi.org/10.1080/13550280590922793>

Moriya, K., Fujie, H., Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Tsutsumi, T., & Ishibashi, K. (1998). The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med.*, 4, 1065-70.

Moriyama, T., Guillhot, S., Klopchin, K., Moss, B., Pinkert, C. A., Palmiter, R. D., Brinster R.L., Kanagawa O., & Chisari, F. V. (1990). Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Science (New York, N.Y.)*, 248(4953), 361–4.

Moussion, C., Ortega, N., & Girard, J.-P. (2008). The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel “alarmin”? *PloS One*, 3(10), e3331. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0003331>

Murphy, G. E. J., Xu, D., Liew, F. Y., & McInnes, I. B. (2010). Role of interleukin 33 in human immunopathology. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69 Suppl 1, i43–47. <http://doi.org/10.1136/ard.2009.120113>

Murray, R. S., Brown, B., Brian, D., & Cabirac, G. F. (1992). Detection of coronavirus RNA and antigen in multiple sclerosis brain. *Annals of Neurology*, 31(5), 525–33. <http://doi.org/10.1002/ana.410310511>

Nagyoszi, P., Wilhelm, I., Farkas, A. E., Fazakas, C., Dung, N. T. K., Haskó, J., & Krizbai, I. A. (2010). Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. *Neurochemistry International*, 57(5), 556–64. <http://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.07.002>

Naito, M., Hasegawa, G., & Takahashi, K. (1997). Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microscopy Research and Technique*, 39(4), 350–64. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19971115\)39:4<350::AID-JEMT5>3.0.CO;2-L](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19971115)39:4<350::AID-JEMT5>3.0.CO;2-L)

Nakajima, A., Iijima, H., Neurath, M. F., Nagaishi, T., Nieuwenhuis, E. E. S., Raychowdhury, R., Glickman J., Blau D.M., Russell S., Holmes K.V., & Blumberg, R. S. (2002). Activation-induced expression of carcinoembryonic antigen-cell adhesion molecule 1 regulates mouse T lymphocyte function. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 168(3), 1028–35.

Nakamoto, N., & Kanai, T. (2014). Role of toll-like receptors in immune activation and tolerance in the liver. *Frontiers in Immunology*, 5, 221. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00221>

Nakamuta, S., Endo, H., Higashi, Y., Kousaka, A., Yamada, H., Yano, M., & Kido, H. (2008). Human immunodeficiency virus type 1 gp120-mediated disruption of tight junction proteins by induction of proteasome-mediated degradation of zonula occludens-1 and -2 in human brain microvascular endothelial cells. *Journal of Neurovirology*, 14(3), 186–95. <http://doi.org/10.1080/13550280801993630>

Napetschnig, J., & Wu, H. (2013). Molecular basis of NF- $\kappa$ B signaling. *Annual Review of Biophysics*, 42, 443–68. <http://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130338>

Nash, T. C., & Buchmeier, M. J. (1997). Entry of mouse hepatitis virus into cells by endosomal and nonendosomal pathways. *Virology*, 233(1), 1–8. <http://doi.org/10.1006/viro.1997.8609>

Navas, S., Seo, S. H., Chua, M. M., Das Sarma, J., Lavi, E., Hingley, S. T., & Weiss, S. R. (2001). Murine coronavirus spike protein determines the ability of the virus to replicate in the liver and cause hepatitis. *Journal of Virology*, 75(5), 2452–7. <http://doi.org/10.1128/JVI.75.5.2452-2457.2001>

- Navas, S., & Weiss, S. R. (2003). Murine coronavirus-induced hepatitis: JHM genetic background eliminates A59 spike-determined hepatotropism. *Journal of Virology*, 77(8), 4972–8.
- Nédellec, P., Dveksler, G. S., Daniels, E., Turbide, C., Chow, B., Basile, A. A., Holmes K.V., & Beauchemin, N. (1994). Bgp2, a new member of the carcinoembryonic antigen-related gene family, encodes an alternative receptor for mouse hepatitis viruses. *Journal of Virology*, 68(7), 4525–37.
- Nemeth, E., Baird, A. W., & O'Farrelly, C. (2009). Microanatomy of the liver immune system. *Seminars in Immunopathology*, 31(3), 333–43. <http://doi.org/10.1007/s00281-009-0173-4>
- Neumann, K., Erben, U., Kruse, N., Wechsung, K., Schumann, M., Klugewitz, K., Scheffold A., & Kühl, A. A. (2015). Chemokine Transfer by Liver Sinusoidal Endothelial Cells Contributes to the Recruitment of CD4+ T Cells into the Murine Liver. *PLoS One*, 10(6), e0123867. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0123867>
- Newton, K., & Dixit, V. M. (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(3). <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a006049>
- Nguyen, J.H. (2013). Blood-brain barrier in acute liver failure. *Neurochem Int.*, 60(7), 676–83. <http://doi: 10.1016/j.neuint.2011.10.012>
- Ning, Q., Lakatoo, S., Liu, M., Yang, W., Wang, Z., Phillips, M. J., & Levy, G. A. (2003). Induction of prothrombinase fgl2 by the nucleocapsid protein of virulent mouse hepatitis virus is dependent on host hepatic nuclear factor-4 alpha. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 15541–9. <http://doi.org/10.1074/jbc.M212806200>
- Ning, Q., Liu, M., Kongkham, P., Lai, M. M., Marsden, P. A., Tseng, J., Pereira B., Belyavskiy M., Leibowitz J., Phillips M.J., & Levy, G. (1999). The nucleocapsid protein of murine hepatitis virus type 3 induces transcription of the novel fgl2 prothrombinase gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(15), 9930–6.
- Noseworthy, J. H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., & Weinshenker, B. G. (2000). Multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 343(13), 938–52. <http://doi.org/10.1056/NEJM200009283431307>
- Novobrantseva, T. I., Majeau, G. R., Amatucci, A., Kogan, S., Brenner, I., Casola, S., Shlomchik M.J., Kotliansky V., Hochman P.S., & Ibraghimov, A. (2005). Attenuated liver fibrosis in the absence of B cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(11), 3072–82. <http://doi.org/10.1172/JCI24798>

- O'Garra, A., Chang, R., Go, N., Hastings, R., Haughton, G., & Howard, M. (1992). Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *European Journal of Immunology*, 22(3), 711–7. <http://doi.org/10.1002/eji.1830220314>
- O'Neill, L. A. J., & Bowie, A. G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews. Immunology*, 7(5), 353–64. <http://doi.org/10.1038/nri2079>
- O'Neill, L. A. J., Golenbock, D., & Bowie, A. G. (2013). The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 13(6), 453–60. <http://doi.org/10.1038/nri3446>
- Obermeier, B., Daneman, R., & Ransohoff, R. M. (2013). Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature Medicine*, 19(12), 1584–96. <http://doi.org/10.1038/nm.3407>
- Oda, M., Yokomori, H., & Han, J.-Y. (2003). Regulatory mechanisms of hepatic microcirculation. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 29(3-4), 167–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14724338>
- Ohtsuka, N., & Taguchi, F. (1997). Mouse susceptibility to mouse hepatitis virus infection is linked to viral receptor genotype. *Journal of Virology*, 71(11), 8860–3.
- Ohtsuka, N., Yamada, Y. K., & Taguchi, F. (1996). Difference in virus-binding activity of two distinct receptor proteins for mouse hepatitis virus. *The Journal of General Virology*, 77 ( Pt 8), 1683–92.
- Olson, L. C., Buescher, E. L., Artenstein, M. S., & Parkman, P. D. (1967). Herpesvirus infections of the human central nervous system. *The New England Journal of Medicine*, 277(24), 1271–7. <http://doi.org/10.1056/NEJM196712142772401>
- Oppenheim, J. J., & Yang, D. (2005). Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Current Opinion in Immunology*, 17(4), 359–65. <http://doi.org/10.1016/j.coi.2005.06.002>
- Ortego, J., Ceriani, J. E., Patiño, C., Plana, J., & Enjuanes, L. (2007). Absence of E protein arrests transmissible gastroenteritis coronavirus maturation in the secretory pathway. *Virology*, 368(2), 296–308. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2007.05.032>
- Osburn, W. O., Levine, J. S., Chattergoon, M. A., Thomas, D. L., & Cox, A. L. (2013). Anti-inflammatory cytokines, pro-fibrogenic chemokines and persistence of acute HCV infection. *Journal of Viral Hepatitis*, 20(6), 404–13. <http://doi.org/10.1111/jvh.12052>

Oth, D., Lussier, G., Cainelli-Gebara, V. C., & Dupuy, J. M. (1991). Susceptibility to murine hepatitis virus (type 3)-induced paralysis is influenced by class I genes of the MHC. *European Journal of Immunogenetics : Official Journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics*, 18(5-6), 405–10.

Oztas, E., Kuzu, U.B., Zengin, N.I., Kalkan, I.H., Onder, F.O., Yildiz, H., Celik, H.T., Akdogan, M., Kilic, M.Y., Koksak, A.S., Odemis, B., Suna, N., & Kayacetin, E. (2015). Can Serum ST2 Levels Be Used as a Marker of Fibrosis in Chronic Hepatitis B Infection? *Medicine (Baltimore)*, 94(47), e1889. <http://doi.org/10.1097/MD.0000000000001889>.

Panés, J., Pérez-del-Pulgar, S., Casadevall, M., Salas, A., Pizcueta, P., Bosch, J., Anderson D.C., Granger D.N., & Piqué, J. M. (1999). Impaired mesenteric leukocyte recruitment in experimental portal hypertension in the rat. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 30(2), 445–53. <http://doi.org/10.1002/hep.510300214>

Park, H., Serti, E., Eke, O., Muchmore, B., Prokunina-Olsson, L., Capone, S., Folgori A., & Rehermann, B. (2012). IL-29 is the dominant type III interferon produced by hepatocytes during acute hepatitis C virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 56(6), 2060–70. <http://doi.org/10.1002/hep.25897>

Parra, B., Hinton, D. R., Lin, M. T., Cua, D. J., & Stohlman, S. A. (1997). Kinetics of cytokine mRNA expression in the central nervous system following lethal and nonlethal coronavirus-induced acute encephalomyelitis. *Virology*, 233(2), 260–70. <http://doi.org/10.1006/viro.1997.8613>

Parra, B., Hinton, D. R., Marten, N. W., Bergmann, C. C., Lin, M. T., Yang, C. S., & Stohlman, S. A. (1999). IFN-gamma is required for viral clearance from central nervous system oligodendroglia. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(3), 1641–7.

Patkar, C., Giaya, K., & Libraty, D. H. (2013). Dengue virus type 2 modulates endothelial barrier function through CD73. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(1), 89–94. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0474>

Pereira, C. A., Steffan, A. M., & Kirn, A. (1984). Interaction between mouse hepatitis viruses and primary cultures of Kupffer and endothelial liver cells from resistant and susceptible inbred mouse strains. *The Journal of General Virology*, 65 ( Pt 9), 1617–20.

Perlman, S., & Netland, J. (2009). Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(6), 439–50. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2147>

Persidsky, Y., Heilman, D., Haorah, J., Zelivyanskaya, M., Persidsky, R., Weber, G. A., Shimokawa H., Kaibuchi K., & Ikezu, T. (2006). Rho-mediated regulation of tight junctions during monocyte migration across the blood-brain barrier in HIV-1 encephalitis (HIVE). *Blood*, 107(12), 4770–80. <http://doi.org/10.1182/blood-2005-11-4721>



- Pewe, L., Wu, G. F., Barnett, E. M., Castro, R. F., & Perlman, S. (1996). Cytotoxic T cell-resistant variants are selected in a virus-induced demyelinating disease. *Immunity*, 5(3), 253–62.
- Peyrefitte, C. N., Pastorino, B., Grau, G. E., Lou, J., Tolou, H., & Couissinier-Paris, P. (2006). Dengue virus infection of human microvascular endothelial cells from different vascular beds promotes both common and specific functional changes. *Journal of Medical Virology*, 78(2), 229–42. <http://doi.org/10.1002/jmv.20532>
- Phares, T. W., Kean, R. B., Mikheeva, T., & Hooper, D. C. (2006). Regional differences in blood-brain barrier permeability changes and inflammation in the apathogenic clearance of virus from the central nervous system. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(12), 7666–75.
- Phares, T. W., Ramakrishna, C., Parra, G. I., Epstein, A., Chen, L., Atkinson, R., Stohlman S.A., & Bergmann, C. C. (2009). Target-dependent B7-H1 regulation contributes to clearance of central nervous system infection and dampens morbidity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(9), 5430–8. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0803557>
- Phillips, J. J., Chua, M., Seo, S. H., & Weiss, S. R. (2001). Multiple regions of the murine coronavirus spike glycoprotein influence neurovirulence. *Journal of Neurovirology*, 7(5), 421–31. <http://doi.org/10.1080/135502801753170273>
- Phillips, J. M., & Weiss, S. R. (2011). Pathogenesis of neurotropic murine coronavirus is multifactorial. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(1), 2–7. <http://doi.org/10.1016/j.tips.2010.11.001>
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Naslund, T. I., Liljestrom, P., Weber, F., & Reis e Sousa, C. (2006). RIG-I-Mediated Antiviral Responses to Single-Stranded RNA Bearing 5'-Phosphates. *Science*, 314(5801), 997–1001. <http://doi.org/10.1126/science.1132998>
- Pircher, J., Czermak, T., Merkle, M., Mannell, H., Krötz, F., Ribeiro, A., Vielhauer V., Nadjiri J., Gaitzsch E., Niemeyer M., Porubsky S., Gröne H.J., & Wörnle, M. (2014). Hepatitis C virus induced endothelial inflammatory response depends on the functional expression of TNF $\alpha$  receptor subtype 2. *PloS One*, 9(11), e113351. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0113351>
- Pöhlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G. J., Lin, G., Granelli-Piperno A., Doms R.W., Rice C.M., & McKeating, J. A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *Journal of Virology*, 77(7), 4070–80.
- Pope, M., Rotstein, O., Cole, E., Sinclair, S., Parr, R., Cruz, B., Fingerote, R., Chung, S., Gorczynski, R., Fung, L., Leibowitz, Y., Rao, S., Levy, G. (1995) Pattern of disease after murine hepatitis virus strain 3 infection correlates with macrophage activation and not viral replication. *Journal of Virology*, 69, 5252-60.

Pope, M., Marsden, P. A., Cole, E., Sloan, S., Fung, L. S., Ning, Q., Ding J.W., Leibowitz J.L., Phillips M.J., & Levy, G. A. (1998). Resistance to murine hepatitis virus strain 3 is dependent on production of nitric oxide. *Journal of Virology*, 72(9), 7084–90.

Preiss, S., Thompson, A., Chen, X., Rodgers, S., Markovska, V., Desmond, P., Visvanathan K., Li K., Locarnini S., & Revill, P. (2008). Characterization of the innate immune signalling pathways in hepatocyte cell lines. *Journal of Viral Hepatitis*, 15(12), 888–900. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2008.01001.x>

Prentice, E., Jerome, W. G., Yoshimori, T., Mizushima, N., & Denison, M. R. (2004). Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(11), 10136–41. <http://doi.org/10.1074/jbc.M306124200>

Prentice, E., McAuliffe, J., Lu, X., Subbarao, K., & Denison, M. R. (2004). Identification and characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase proteins. *Journal of Virology*, 78(18), 9977–86. <http://doi.org/10.1128/JVI.78.18.9977-9986.2004>

Protzer, U., Maini, M. K., & Knolle, P. A. (2012). Living in the liver: hepatic infections. *Nature Reviews. Immunology*, 12(3), 201–13. <http://doi.org/10.1038/nri3169>

Pu, Y., & Zhang, X. (2008). Mouse hepatitis virus type 2 enters cells through a clathrin-mediated endocytic pathway independent of Eps15. *Journal of Virology*, 82(16), 8112–23. <http://doi.org/10.1128/JVI.00837-08>

Pulzova, L., Bhide, M. R., & Andrej, K. (2009). Pathogen translocation across the blood-brain barrier. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 57(3), 203–213. <http://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2009.00594.x>

Qian, F., Bolen, C. R., Jing, C., Wang, X., Zheng, W., Zhao, H., Fikrig E., Bruce R.D., Kleinstein S.H., & Montgomery, R. R. (2013). Impaired toll-like receptor 3-mediated immune responses from macrophages of patients chronically infected with hepatitis C virus. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*, 20(2), 146–55. <http://doi.org/10.1128/CVI.00530-12>

Qian, Y., Commane, M., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., & Li, X. (2001). IRAK-mediated translocation of TRAF6 and TAB2 in the interleukin-1-induced activation of NFkappa B. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(45), 41661–7. <http://doi.org/10.1074/jbc.M102262200>

Qiu, Z., Hingley, S. T., Simmons, G., Yu, C., Das Sarma, J., Bates, P., & Weiss, S. R. (2006). Endosomal proteolysis by cathepsins is necessary for murine coronavirus mouse hepatitis virus type 2 spike-mediated entry. *Journal of Virology*, 80(12), 5768–76. <http://doi.org/10.1128/JVI.00442-06>

- Qu, L., Feng, Z., Yamane, D., Liang, Y., Lanford, R. E., Li, K., & Lemon, S. M. (2011). Disruption of TLR3 signaling due to cleavage of TRIF by the hepatitis A virus protease-polymerase processing intermediate, 3CD. *PLoS Pathogens*, 7(9), e1002169. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002169>
- Raamsman, M. J., Locker, J. K., de Hooge, A., de Vries, A. A., Griffiths, G., Vennema, H., & Rottier, P. J. (2000). Characterization of the coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 small membrane protein E. *Journal of Virology*, 74(5), 2333–42.
- Ramadori, G., Moriconi, F., Malik, I., & Dudas, J. (2008). Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. *Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 59 Suppl 1, 107–17.
- Ramakrishna, C., Bergmann, C. C., Atkinson, R., & Stohlman, S. A. (2003). Control of central nervous system viral persistence by neutralizing antibody. *Journal of Virology*, 77(8), 4670–8.
- Ramakrishna, C., Bergmann, C. C., Holmes, K. V, & Stohlman, S. A. (2004). Expression of the mouse hepatitis virus receptor by central nervous system microglia. *Journal of Virology*, 78(14), 7828–32. <http://doi.org/10.1128/JVI.78.14.7828-7832.2004>
- Ramakrishna, C., Stohlman, S. A., Atkinson, R. A., Hinton, D. R., & Bergmann, C. C. (2004). Differential regulation of primary and secondary CD8+ T cells in the central nervous system. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(10), 6265–73.
- Ranger-Rogez, S., Alain, S., & Denis, F. (2002). [Hepatitis viruses: mother to child transmission]. *Pathologie-Biologie*, 50(9), 568–75.
- Rao, P. V, Kumari, S., & Gallagher, T. M. (1997). Identification of a contiguous 6-residue determinant in the MHV receptor that controls the level of virion binding to cells. *Virology*, 229(2), 336–48. <http://doi.org/10.1006/viro.1997.8446>
- Reguera, J., Mudgal, G., Santiago, C., & Casasnovas, J. M. (2014). A structural view of coronavirus-receptor interactions. *Virus Research*, 194, 3–15. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.10.005>
- Rehermann, B., & Nascimbeni, M. (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature Reviews. Immunology*, 5(3), 215–29. <http://doi.org/10.1038/nri1573>
- Reina, J., López-Causapé, C., Rojo-Molinero, E., & Rubio, R. (2014). Clinico-epidemiological characteristics of acute respiratory infections caused by coronavirus OC43, NL63 and 229E. *Revista Clinica Espanola*, 214(9), 499–504. <http://doi.org/10.1016/j.rce.2014.05.020>
- Rempel, J. D., Murray, S. J., Meisner, J., & Buchmeier, M. J. (2004). Differential regulation of innate and adaptive immune responses in viral encephalitis. *Virology*, 318(1), 381–92. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2003.09.023>

- Riordan, S. M., Skinner, N. A., Kurtovic, J., Locarnini, S., McIver, C. J., Williams, R., & Visvanathan, K. (2006). Toll-like receptor expression in chronic hepatitis C: correlation with pro-inflammatory cytokine levels and liver injury. *Inflammation Research : Official Journal of the European Histamine Research Society*, 55(7), 279–85. <http://doi.org/10.1007/s00011-006-0082-0>
- Roberts, T. K., Buckner, C. M., & Berman, J. W. (2010). Leukocyte transmigration across the blood-brain barrier: perspectives on neuroAIDS. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 15, 478–536.
- Romero, J. R., & Newland, J. G. (2003). Viral meningitis and encephalitis: traditional and emerging viral agents. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 14(2), 72–82. <http://doi.org/10.1053/spid.2003.127223>
- Ronit, A., Salem, M., Hartling, H. J., Gaardbo, J. C., Ullum, H., Gerstoft, J., & Nielsen, S. D. (2013). Dysregulation of toll-like receptor (TLR) 2 expression on monocytes and upregulation of the frequency of T cells expressing TLR2 in patients with chronic hepatitis C virus infection. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 121(5), 437–46. <http://doi.org/10.1111/apm.12013>
- Rose, K. M., & Weiss, S. R. (2009). Murine coronavirus cell type dependent interaction with the type I interferon response. *Viruses*, 1(3), 689–712. <http://doi.org/10.3390/v1030689>
- Rotbart, H. A. (2000). Viral meningitis. *Seminars in Neurology*, 20(3), 277–92. <http://doi.org/10.1055/s-2000-9427>
- Roth, G. A., Zimmermann, M., Lubczyk, B. A., Pilz, J., Faybik, P., Hetz, H., Hacker S., Mangold A., Bacher A., Krenn C.G., & Ankersmit, H. J. (2010). Up-regulation of interleukin 33 and soluble ST2 serum levels in liver failure. *The Journal of Surgical Research*, 163(2), e79–83. <http://doi.org/10.1016/j.jss.2010.04.004>
- 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), 9829–38. <http://doi.org/10.1128/JVI.01199-08>
- Roth-Cross, J. K., Martinez-Sobrido, L., Scott, E. P., Garcia-Sastre, A., & Weiss, S. R. (2007). Inhibition of the Alpha/Beta Interferon Response by Mouse Hepatitis Virus at Multiple Levels. *Journal of Virology*, 81(13), 7189–7199. <http://doi.org/10.1128/JVI.00013-07>
- Rowe, I. a., Galsinh, S. K., Wilson, G. K., Parker, R., Durant, S., Lazar, C., Branza-Nichita N., Bicknell R., Adams D.H., Balfe P., & Mckeating, J. A. (2014). Paracrine signals from liver sinusoidal endothelium regulate hepatitis C virus replication. *Hepatology*, 59(2), 375–384. <http://doi.org/10.1002/hep.26571>

Rushbrook, S. M., Ward, S. M., Unitt, E., Vowler, S. L., Lucas, M., Klenerman, P., & Alexander, G. J. M. (2005). Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells during persistent hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*, 79(12), 7852–9. <http://doi.org/10.1128/JVI.79.12.7852-7859.2005>

Saha, S. K., Pietras, E. M., He, J. Q., Kang, J. R., Liu, S.-Y., Oganessian, G., Shahangian A., Zarnegar B., Shiba T.L., Wang Y., & Cheng, G. (2006). Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *The EMBO Journal*, 25(14), 3257–63. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601220>

Sahin, H., Borkham-Kamphorst, E., do O, N. T., Berres, M.-L., Kaldenbach, M., Schmitz, P., Weiskirchen R., Liedtke C., Streetz K.L., Maedler K., Trautwein C., & Wasmuth, H. E. (2013). Proapoptotic effects of the chemokine, CXCL 10 are mediated by the noncognate receptor TLR4 in hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 57(2), 797–805. <http://doi.org/10.1002/hep.26069>

Saiman, Y., & Friedman, S. L. (2012). The role of chemokines in acute liver injury. *Frontiers in Physiology*, 3, 213. <http://doi.org/10.3389/fphys.2012.00213>

Saitoh, T., Komano, J., Saitoh, Y., Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Uehata T., Iwasaki H., Omori H., Yamaoka S., Yamamoto N., & Akira, S. (2012). Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host & Microbe*, 12(1), 109–16. <http://doi.org/10.1016/j.chom.2012.05.015>

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), 645–55. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2395>

Samuel, M. A., Wang, H., Siddharthan, V., Morrey, J. D., & Diamond, M. S. (2007). Axonal transport mediates West Nile virus entry into the central nervous system and induces acute flaccid paralysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(43), 17140–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.0705837104>

Santodomingo-Garzon, T., Han, J., Le, T., Yang, Y., & Swain, M. G. (2009). Natural killer T cells regulate the homing of chemokine CXC receptor 3-positive regulatory T cells to the liver in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 49(4), 1267–76. <http://doi.org/10.1002/hep.22761>

Sasai, M., Shingai, M., Funami, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Matsumoto, M., & Seya, T. (2006). NAK-associated protein 1 participates in both the TLR3 and the cytoplasmic pathways in type I IFN induction. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177(12), 8676–83.

Sato, K., Ishikawa, T., Okumura, A., Yamauchi, T., Sato, S., Ayada, M., Matsumoto E., Hotta N., Oohashi T., Fukuzawa Y., & Kakumu, S. (2007). Expression of Toll-like receptors in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22(10), 1627–32. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04783.x>

Sato, S., Sugiyama, M., Yamamoto, M., Watanabe, Y., Kawai, T., Takeda, K., & Akira, S. (2003). Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like re. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(8), 4304–10.

Sawaki, J., Tsutsui, H., Hayashi, N., Yasuda, K., Akira, S., Tanizawa, T., & Nakanishi, K. (2007). Type 1 cytokine/chemokine production by mouse NK cells following activation of their TLR/MyD88-mediated pathways. *International Immunology*, 19(3), 311–20. <http://doi.org/10.1093/intimm/dx1148>

Schickli, J. H., Zelus, B. D., Wentworth, D. E., Sawicki, S. G., & Holmes, K. V. (1997). The murine coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 from persistently infected murine cells exhibits an extended host range. *Journal of Virology*, 71(12), 9499–507.

Schindler, L., Engler, H., & Kirchner, H. (1982). Activation of natural killer cells and induction of interferon after injection of mouse hepatitis virus type 3 in mice. *Infection and Immunity*, 35(3), 869–73.

Schindler, L., Klimetzek, V., & Kirchner, H. (1983). Bone-marrow derived macrophages as targets for the replication of mouse hepatitis virus type 3. *Immunology Letters*, 7(2), 107–10.

Schrage, A., Loddenkemper, C., Erben, U., Lauer, U., Hausdorf, G., Jungblut, P. R., Johnson J., Knolle P.A., Zeitz M., Hamann A., & Klugewitz, K. (2008). Murine CD146 is widely expressed on endothelial cells and is recognized by the monoclonal antibody ME-9F1. *Histochemistry and Cell Biology*, 129(4), 441–51. <http://doi.org/10.1007/s00418-008-0379-x>

Schümann, J., Wolf, D., Pahl, A., Brune, K., Papadopoulos, T., van Rooijen, N., & Tiegs, G. (2000). Importance of Kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice. *The American Journal of Pathology*, 157(5), 1671–83. [http://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64804-3](http://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64804-3)

Schwabe, R. F., Seki, E., & Brenner, D. A. (2006). Toll-like receptor signaling in the liver. *Gastroenterology*, 130(6), 1886–900. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.01.038>

Scott, C. A., Rossiter, J. P., Andrew, R. D., & Jackson, A. C. (2008). Structural abnormalities in neurons are sufficient to explain the clinical disease and fatal outcome of experimental rabies in yellow fluorescent protein-expressing transgenic mice. *Journal of Virology*, 82(1), 513–21. <http://doi.org/10.1128/JVI.01677-07>

Seki, E., & Brenner, D. A. (2008). Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: Update. *Hepatology*, 48(1), 322–335. <http://doi.org/10.1002/hep.22306>

Seki, E., Tsutsui, H., Tsuji, N. M., Hayashi, N., Adachi, K., Nakano, H., Futatsugi-Yumikura S., Takeuchi O., Hoshino K., Akira S, Fujimoto J., & Nakanishi, K. (2002). Critical roles of myeloid differentiation factor 88-dependent proinflammatory cytokine release in early phase clearance of *Listeria monocytogenes* in mice. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 169(7), 3863–8.

Shim, J.-H., Xiao, C., Paschal, A. E., Bailey, S. T., Rao, P., Hayden, M. S., Lee K.Y., Bussey C., Steckel M., Tanaka N., Yamada G., Akira S., Matsumoto K., & Ghosh, S. (2005). TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes & Development*, 19(22), 2668–81. <http://doi.org/10.1101/gad.1360605>

Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko S., & Liu, Y. J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* (New York, N.Y.), 284(5421), 1835–7.

Simon-Santamaria, J., Rinaldo, C. H., Kardas, P., Li, R., Malovic, I., Elvevold, K., McCourt P., Smedsrød B., Hirsch H.H., & Sørensen, K. K. (2014). Efficient uptake of blood-borne BK and JC polyomavirus-like particles in endothelial cells of liver sinusoids and renal vasa recta. *PloS One*, 9(11), e111762. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0111762>

Sitia, G., Iannacone, M., Aiolfi, R., Isogawa, M., van Rooijen, N., Scozzesi, C., Bianchi M.E., von Andrian U.H., Chisari F.V., & Guidotti, L. G. (2011). Kupffer cells hasten resolution of liver immunopathology in mouse models of viral hepatitis. *PLoS Pathogens*, 7(6), e1002061. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002061>

Sitia, G., Isogawa, M., Kakimi, K., Wieland, S. F., Chisari, F. V., & Guidotti, L. G. (2002). Depletion of neutrophils blocks the recruitment of antigen-nonspecific cells into the liver without affecting the antiviral activity of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13717–22. <http://doi.org/10.1073/pnas.172521999>

Skogland, J. E. (1939). An unusual form of lymphocytic choriomeningitis. *Archives of Neurology And Psychiatry*, 42(3), 507. <http://doi.org/10.1001/archneurpsyc.1939.02270210145007>

Slobodskaya, O., Snijder, E. J., & Spaan, W. J. M. (2012). Organ tropism of murine coronavirus does not correlate with the expression levels of the membrane-anchored or secreted isoforms of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 receptor. *The Journal of General Virology*, 93(Pt 9), 1918–23. <http://doi.org/10.1099/vir.0.043190-0>

Smedsrød, B., Kjellén, L., & Pertoft, H. (1985). Endocytosis and degradation of chondroitin sulphate by liver endothelial cells. *The Biochemical Journal*, 229(1), 63–71.

So, E. Y., & Kim, B. S. (2009). Theiler's virus infection induces TLR3-dependent upregulation of TLR2 critical for proinflammatory cytokine production. *Glia*, 57(11), 1216–26. <http://doi.org/10.1002/glia.20843>

Soares, J.B., Pimentel-Nunes, P., Afonso, L., Rolanda, C., Lopes, P., Roncon-Albuquerque, R. Jr., Gonçalves, N., Boal-Carvalho, I., Pardal, F., Lopes, S., Macedo, G., Lara-Santos, L., Henrique, R., Moreira-Dias, L., Gonçalves, R., Dinis-Ribeiro, M., Leite-Moreira, A.F. (2012). Increased hepatic expression of TLR2 and TLR4 in the hepatic inflammation-fibrosis-carcinoma sequence. *Innate Immun.*, 18(5), 700-8.

Soong, G., Reddy, B., Sokol, S., Adamo, R., & Prince, A. (2004). TLR2 is mobilized into an apical lipid raft receptor complex to signal infection in airway epithelial cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(10), 1482–9. <http://doi.org/10.1172/JCI20773>

Spindler, K. R., & Hsu, T. H. (2012). Viral disruption of the blood-brain barrier. *Trends in Microbiology*, 20(6), 282–290. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2012.03.009>

Stefanovic, L., Brenner, D. A., & Stefanovic, B. (2005). Direct hepatotoxic effect of KC chemokine in the liver without infiltration of neutrophils. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.), 230(8), 573–86.

Steffan, A. M., Pereira, C. A., Bingen, A., Valle, M., Martin, J. P., Koehren, F., Royer C., Gendrault J.L., & Kirn, A. (1995). Mouse hepatitis virus type 3 infection provokes a decrease in the number of sinusoidal endothelial cell fenestrae both in vivo and in vitro. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 22(2), 395–401.

Stewart, C. R., Stuart, L. M., Wilkinson, K., van Gils, J. M., Deng, J., Halle, A., Rayner K.J., Boyer L., Zhong R, Frazier W.A., Lacy-Hulbert A., El Khoury J., Golenbock D.T., Moore, K. J. (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nature Immunology*, 11(2), 155–61. <http://doi.org/10.1038/ni.1836>

Stewart, J. N., Mounir, S., & Talbot, P. J. (1992). Human coronavirus gene expression in the brains of multiple sclerosis patients. *Virology*, 191(1), 502–5.

Stiles, L. N., Hosking, M. P., Edwards, R. A., Strieter, R. M., & Lane, T. E. (2006). Differential roles for CXCR3 in CD4+ and CD8+ T cell trafficking following viral infection of the CNS. *European Journal of Immunology*, 36(3), 613–22. <http://doi.org/10.1002/eji.200535509>

Stohlman, S. A., Bergmann, C. C., Lin, M. T., Cua, D. J., & Hinton, D. R. (1998). CTL effector function within the central nervous system requires CD4+ T cells. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 160(6), 2896–904.



Sturman, L. S., Ricard, C. S., & Holmes, K. V. (1990). Conformational change of the coronavirus peplomer glycoprotein at pH 8.0 and 37 degrees C correlates with virus aggregation and virus-induced cell fusion. *Journal of Virology*, 64(6), 3042–50.

Sugimoto, K., Kaplan, D. E., Ikeda, F., Ding, J., Schwartz, J., Nunes, F. A., Alter H.J., & Chang, K.-M. (2005). Strain-specific T-cell suppression and protective immunity in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*, 79(11), 6976–83. <http://doi.org/10.1128/JVI.79.11.6976-6983.2005>

Sutherland, R. M., Chua, M. M., Lavi, E., Weiss, S. R., & Paterson, Y. (1997). CD4+ and CD8+ T cells are not major effectors of mouse hepatitis virus A59-induced demyelinating disease. *Journal of Neurovirology*, 3(3), 225–8.

Swain, M. G. (2008). Hepatic NKT cells: friend or foe? *Clinical Science (London, England : 1979)*, 114(7), 457–66. <http://doi.org/10.1042/CS20070328>

Swaminathan, G., Pascual, D., Rival, G., Perales-Linares, R., Martin-Garcia, J., & Navas-Martin, S. (2014). Hepatitis C virus core protein enhances HIV-1 replication in human macrophages through TLR2, JNK, and MEK1/2-dependent upregulation of TNF- $\alpha$  and IL-6. *FEBS Lett.*, 588(18), 3501–10.

Swanson, P. A., & McGavern, D. B. (2015). Viral diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Virology*, 11C, 44–54. <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.12.009>

Szomolanyi-Tsuda, E., Liang, X., Welsh, R. M., Kurt-Jones, E. A., & Finberg, R. W. (2006). Role for TLR2 in NK cell-mediated control of murine cytomegalovirus in vivo. *Journal of Virology*, 80(9), 4286–91. <http://doi.org/10.1128/JVI.80.9.4286-4291.2006>

Tacke, F., Luedde, T., & Trautwein, C. (2009). Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 36(1), 4–12. <http://doi.org/10.1007/s12016-008-8091-0>

Taguchi, F., & Hirai-Yuki, A. (2012). Mouse Hepatitis Virus Receptor as a Determinant of the Mouse Susceptibility to MHV Infection. *Frontiers in Microbiology*, 3, 68. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00068>

Tahara, S. M., Dietlin, T. A., Nelson, G. W., Stohlman, S. A., & Manno, D. J. (1998). Mouse hepatitis virus nucleocapsid protein as a translational effector of viral mRNAs. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 440, 313–8.

Takahashi, K., Asabe, S., Wieland, S., Garaigorta, U., Gastaminza, P., Isogawa, M., & Chisari, F. V. (2010). Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(16), 7431–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.1002301107>

- Tanji, H., Ohto, U., Shibata, T., Miyake, K., & Shimizu, T. (2013). Structural reorganization of the Toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6126), 1426–9. <http://doi.org/10.1126/science.1229159>
- Tarantino, G., Di Cristina, A., Pipitone, R., Almasio, P. L., Di Vita, G., Craxi, A., & Grimaudo, S. (2013). In vivo liver expression of TLR2, TLR3 and TLR7 in chronic hepatitis C. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 27(1), 233–9.
- Tarao, K., Ohkawa, S., Miyagi, Y., Morinaga, S., Ohshige, K., & Yamamoto, N., (2013). Inflammation in background cirrhosis evokes malignant progression in HCC development from HCV-associated liver cirrhosis. *Scand J Gastroenterol*, 48(6), 729-35.
- Tardieu, M., Boespflug, O., & Barbé, T. (1986). Selective tropism of a neurotropic coronavirus for ependymal cells, neurons, and meningeal cells. *Journal of Virology*, 60(2), 574–82.
- Tardieu, M., Goffinet, A., Harmant-van Rijckevorsel, G., & Lyon, G. (1982). Ependymitis, leukoencephalitis, hydrocephalus, and thrombotic vasculitis following chronic infection by mouse hepatitis virus 3 (MHV 3). *Acta Neuropathologica*, 58(3), 168–76.
- Tatu, C., Ye, J., Arnold, L. W., & Clarke, S. H. (1999). Selection at multiple checkpoints focuses V(H)12 B cell differentiation toward a single B-1 cell specificity. *The Journal of Experimental Medicine*, 190(7), 903–14.
- Temburni, M. K., & Jacob, M. H. (2001). New functions for glia in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), 3631–2. <http://doi.org/10.1073/pnas.081073198>
- Templeton, S. P., Kim, T. S., O'Malley, K., & Perlman, S. (2008). Maturation and localization of macrophages and microglia during infection with a neurotropic murine coronavirus. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 18(1), 40–51. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00098.x>
- Terahara, K., Yoshida, M., Taguchi, F., Igarashi, O., Nochi, T., Gotoh, Y., Yamamoto T., Tsunetsugu-Yokota Y., Beauchemin N., & Kiyono, H. (2009). Expression of newly identified secretory CEACAM1(a) isoforms in the intestinal epithelium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 383(3), 340–6. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.04.008>
- Thomas, A., Laxton, C., Rodman, J., Myangar, N., Horscroft, N., & Parkinson, T. (2007). Investigating Toll-like receptor agonists for potential to treat hepatitis C virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(8), 2969–78. <http://doi.org/10.1128/AAC.00268-07>

Thomas, D., & Zoulim, F. (2012). New challenges in viral hepatitis. *Gut*, 61(Suppl 1), i1–i5. <http://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302122>

Thomson, A. W., & Knolle, P. A. (2010). Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nature Reviews. Immunology*, 10(11), 753–766. <http://doi.org/10.1038/nri2858>

Tiegs, G., & Lohse, A. W. (2010). Immune tolerance: What is unique about the liver. *Journal of Autoimmunity*, 34(1), 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.08.008>

Tschen, S.-I., Bergmann, C. C., Ramakrishna, C., Morales, S., Atkinson, R., & Stohlman, S. A. (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), 2922–9.

Tshako, M. H., Augusto, O., Linares, E., Dagli, M. L. Z., & Pereira, C. A. (2006). Association between nitric oxide synthesis and vaccination-acquired resistance to murine hepatitis virus by spf mice. *Free Radical Biology & Medicine*, 41(10), 1534–41. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.08.011>

Tyrrell, D. A., Almeida, J. D., Cunningham, C. H., Dowdle, W. R., Hofstad, M. S., McIntosh, K., Tajima M., Zakstelskaya L.Y., Easterday B.C., Kapikian A., & Bingham, R. W. (1975). Coronaviridae. *Intervirology*, 5(1-2), 76–82.

Tyrrell, D. A., & Bynoe, M. L. (1966). Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. *Lancet (London, England)*, 1(7428), 76–7.

Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Asford, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio T., Connolly J., Fay J.W., Pascual V., Palucka A.K., & Banchereau, J. (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunological Reviews*, 219, 118–42. <http://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00551.x>

Ujike, M., & Taguchi, F. (2015). Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions. *Viruses*, 7(4), 1700–25. <http://doi.org/10.3390/v7041700>

Vabret, A., Dina, J., Brison, E., Brouard, J., & Freymuth, F. (2009). [Human coronaviruses]. *Pathologie-Biologie*, 57(2), 149–60. <http://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.02.018>

Van Den Pol, A. N., Mocarski, E., Saederup, N., Vieira, J., & Meier, T. J. (1999). Cytomegalovirus cell tropism, replication, and gene transfer in brain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(24), 10948–65.

Vassão, R. C., Mello, I. G., & Pereira, C. A. (1994). Role of macrophages, interferon gamma and procoagulant activity in the resistance of genetic heterogeneous mouse populations to mouse hepatitis virus infection. *Archives of Virology*, 137(3-4), 277–88.

Vassão, R., & Pereira, C. A. (1994). Antiviral activity of interferon gamma in vivo during mouse hepatitis virus infection. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et Al.]*, 27(10), 2407–11.

Vennema, H., Godeke, G. J., Rossen, J. W., Voorhout, W. F., Horzinek, M. C., Opstelten, D. J., & Rottier, P. J. (1996). Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *The EMBO Journal*, 15(8), 2020–8.

Verinaud, L., Da Cruz-Höfling, M. A., Sakurada, J. K., Rangel, H. A., Vassallo, J., Wakelin, D., Sewell H.F., & Camargo, I. J. (1998). Immunodepression induced by *Trypanosoma cruzi* and mouse hepatitis virus type 3 is associated with thymus apoptosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5(2), 186–91.

Verma, S., Lo, Y., Chapagain, M., Lum, S., Kumar, M., Gurjav, U., Luo H., Nakatsuka A., & Nerurkar, V. R. (2009). West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier. *Virology*, 385(2), 425–33. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.047>

Verma, S., Nakaoke, R., Dohgu, S., & Banks, W. A. (2006). Release of cytokines by brain endothelial cells: A polarized response to lipopolysaccharide. *Brain, Behavior, and Immunity*, 20(5), 449–55. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2005.10.005>

Versteeg, G. A., Bredenbeek, P. J., van den Worm, S. H. E., & Spaan, W. J. M. (2007). Group 2 coronaviruses prevent immediate early interferon induction by protection of viral RNA from host cell recognition. *Virology*, 361(1), 18–26. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2007.01.020>

Villalba, M., Hott, M., Martin, C., Aguila, B., Valdivia, S., Quezada, C., Zambrano A., Concha M.I., & Otth, C. (2012). Herpes simplex virus type 1 induces simultaneous activation of Toll-like receptors 2 and 4 and expression of the endogenous ligand serum amyloid A in astrocytes. *Medical Microbiology and Immunology*, 201(3), 371–9. <http://doi.org/10.1007/s00430-012-0247-0>

Virelizier, J. L., Dayan, A. D., & Allison, A. C. (1975). Neuropathological effects of persistent infection of mice by mouse hepatitis virus. *Infection and Immunity*, 12(5), 1127–40.

Volarevic, V., Mitrovic, M., Milovanovic, M., Zelen, I., Nikolic, I., Mitrovic, S., Pejnovic N., Arsenijevic N., & Lukic, M. L. (2012). Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A-induced hepatitis. *Journal of Hepatology*, 56(1), 26–33. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.03.022>

Volle, R., Archimbaud, C., Couraud, P.-O., Romero, I. A., Weksler, B., Mirand, A., Pereira B., Henquell C., Peigue-Lafeuille H., & Bailly, J.-L. (2015). Differential permissivity of human cerebrovascular endothelial cells to enterovirus infection and specificities of enterovirus 71 in crossing an in vitro model of human blood brain barrier. *The Journal of General Virology*. <http://doi.org/10.1099/vir.0.000103>

Walker, C. M., Feng, Z., & Lemon, S. M. (2015). Reassessing immune control of hepatitis A virus. *Current Opinion in Virology*, 11C, 7–13. <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.01.003>

Wang, J., Cai, Y., Ji, H., Feng, J., Ayana, D. A., Niu, J., & Jiang, Y. (2012a). Serum IL-33 levels are associated with liver damage in patients with chronic hepatitis B. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 32(6), 248–53. <http://doi.org/10.1089/jir.2011.0109>

Wang, J., Zhao, P., Guo, H., Sun, X., Jiang, Z., Xu, L., Feng J., Niu J., & Jiang, Y. (2012b). Serum IL-33 levels are associated with liver damage in patients with chronic hepatitis C. *Mediators of Inflammation*, 2012, 819636. <http://doi.org/10.1155/2012/819636>

Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L., Anderson, J. F., Fikrig, E., & Flavell, R. A. (2004). Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nature Medicine*, 10(12), 1366–73. <http://doi.org/10.1038/nm1140>

Wasmuth, H. E., Tacke, F., & Trautwein, C. (2010). Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Seminars in Liver Disease*, 30(3), 215–25. <http://doi.org/10.1055/s-0030-1255351>

Watanabe, T., Dohgu, S., Takata, F., Nishioku, T., Nakashima, A., Futagami, K., Yamauchi A., & Kataoka, Y. (2013). Paracellular barrier and tight junction protein expression in the immortalized brain endothelial cell lines bEND.3, bEND.5 and mouse brain endothelial cell 4. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 36(3), 492–5. <http://doi.org/10.1248/bpb.b12-00915>

Wei, C., Cui-Ming, S., Pei, L. (2013). Alterations of blood-brain barrier and associated factors in acute liver failure. *Gastroenterol Res Pract*, 841707 <http://doi: 10.1155/2013/841707>

Weiss, S. R., & Navas-Martin, S. (2005). Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 69(4), 635–64. <http://doi.org/10.1128/MMBR.69.4.635-664.2005>

Weissenborn, K., Tryc, A. B., Heeren, M., Worthmann, H., Pflugrad, H., Berding, G., Bokemeyer M., Tillmann H.L., & Goldbecker, A. (2009). Hepatitis C virus infection and the brain. *Metabolic Brain Disease*, 24(1), 197–210. <http://doi.org/10.1007/s11011-008-9130-5>

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

Wijburg, O. L., Heemskerk, M. H., Sanders, A., Boog, C. J., & Van Rooijen, N. (1996). Role of virus-specific CD4<sup>+</sup> cytotoxic T cells in recovery from mouse hepatitis virus infection. *Immunology*, 87(1), 34–41.

Williams, D. W., Veenstra, M., Gaskill, P. J., Morgello, S., Calderon, T. M., & Berman, J. W. (2014). Monocytes mediate HIV neuropathogenesis: mechanisms that contribute to HIV associated neurocognitive disorders. *Current HIV Research*, 12(2), 85–96.

Wilson, L., Gage, P., & Ewart, G. (2006). Hexamethylene amiloride blocks E protein ion channels and inhibits coronavirus replication. *Virology*, 353(2), 294–306. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2006.05.028>

Wisse, E., De Zanger, R. B., Charels, K., Van Der Smissen, P., & McCuskey, R. S. (1985). The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 5(4), 683–92.

Wong, J., Johnston, B., Lee, S. S., Bullard, D. C., Smith, C. W., Beaudet, A. L., & Kubes, P. (1997). A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature. *The Journal of Clinical Investigation*, 99(11), 2782–90. <http://doi.org/10.1172/JCI119468>

Wu, J., Meng, Z., Jiang, M., Pei, R., Trippler, M., Broering, R., Bucchi A., Sowa J.P., Dittmer U., Yang D., Roggendorf M., Gerken G., Lu M., & Schlaak, J. F. (2009). Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 49(4), 1132–40. <http://doi.org/10.1002/hep.22751>

Wu, J., Meng, Z., Jiang, M., Zhang, E., Trippler, M., Broering, R., Bucchi A., Krux F., Dittmer U., Yang D., Roggendorf M., Gerken G., Lu M., & Schlaak, J. F. (2010). Toll-like receptor-induced innate immune responses in non-parenchymal liver cells are cell type-specific. *Immunology*, 129(3), 363–374. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03179.x>

Xu, H., Li, H., Cao, D., Wu, Y., & Chen, Y. (2014). Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) receptor-I is required for TNF- $\alpha$ -mediated fulminant virus hepatitis caused by murine hepatitis virus strain-3 infection. *Immunology Letters*, 158(1-2), 25–32. <http://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.11.008>

Xu, N., Yao, H., Sun, Z., & Chen, Z. (2008). Toll-like receptor 7 and 9 expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis B and related hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(2), 239–44. <http://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00711.x>

Xu, R., Feng, X., Xie, X., Zhang, J., Wu, D., & Xu, L. (2012). HIV-1 Tat protein increases the permeability of brain endothelial cells by both inhibiting occludin expression and cleaving occludin via matrix metalloproteinase-9. *Brain Research*, 1436, 13–9. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.11.052>

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi O., Takeda K., & Akira, S. (2003). TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nature Immunology*, 4(11), 1144–50. <http://doi.org/10.1038/ni986>

Yang, C., Chen, Y., Guo, G., Li, H., Cao, D., Xu, H., Guo S., Fei L., Yan W., Ning Q., Zheng L., & Wu, Y. (2013). Expression of B and T lymphocyte attenuator (BTLA) in macrophages contributes to the fulminant hepatitis caused by murine hepatitis virus strain-3. *Gut*, 62(8), 1204–13. <http://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302239>

Yang, L., & Seki, E. (2012). Toll-like receptors in liver fibrosis: cellular crosstalk and mechanisms. *Frontiers in Physiology*, 3, 138. <http://doi.org/10.3389/fphys.2012.00138>

Yang, P. L., Althage, A., Chung, J., Maier, H., Wieland, S., Isogawa, M., & Chisari, F. V. (2010). Immune effectors required for hepatitis B virus clearance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(2), 798–802. <http://doi.org/10.1073/pnas.0913498107>

Yang, Q., Shi, Y., Yang, Y., Lou, G., & Chen, Z. (2015). The sterile inflammation in the exacerbation of HBV-associated liver injury. *Mediators of Inflammation*, 2015, 508681. <http://doi.org/10.1155/2015/508681>

Yang, Y., Liang, Y., Qu, L., Chen, Z., Yi, M., Li, K., & Lemon, S. M. (2007). Disruption of innate immunity due to mitochondrial targeting of a picornaviral protease precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(17), 7253–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.0611506104>

Ye, Y., Hauns, K., Langland, J. O., Jacobs, B. L., & Hogue, B. G. (2007). Mouse hepatitis coronavirus A59 nucleocapsid protein is a type I interferon antagonist. *Journal of Virology*, 81(6), 2554–63. <http://doi.org/10.1128/JVI.01634-06>

Yen, L. F., Wei, V. C., Kuo, E. Y., & Lai, T. W. (2013). Distinct patterns of cerebral extravasation by Evans blue and sodium fluorescein in rats. *PloS One*, 8(7), e68595. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0068595>

Yokomori, H., Ando, W., Yoshimura, K., Yamazaki, H., Takahashi, Y., & Oda, M. (2015). Increases in endothelial caveolin-1 and cavins correlate with cirrhosis progression. *Micron (Oxford, England : 1993)*, 76, 52–61. <http://doi.org/10.1016/j.micron.2015.03.009>

Yokomori, H., Oda, M., Ogi, M., Kamegaya, Y., Tsukada, N., & Ishii, H. (2001). Endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 are co-localized in sinusoidal endothelial fenestrae. *Liver*, 21(3), 198–206. <http://doi.org/10.1034/j.1600-0676.2001.021003198.x>

Yokomori, H., Oda, M., Yoshimura, K., & Hibi, T. (2012a). Recent advances in liver sinusoidal endothelial ultrastructure and fine structure immunocytochemistry. *Micron*, 43(2-3), 129–134. <http://doi.org/10.1016/j.micron.2011.08.002>

Yokomori, H., Oda, M., Yoshimura, K., & Hibi, T. (2012b). Recent advances in liver sinusoidal endothelial ultrastructure and fine structure immunocytochemistry. *Micron* (Oxford, England : 1993), 43(2-3), 129–34. <http://doi.org/10.1016/j.micron.2011.08.002>

Yokomori, H., Oda, M., Yoshimura, K., Nomura, M., Wakabayashi, G., Kitajima, M., & Ishii, H. (2003). Elevated expression of caveolin-1 at protein and mRNA level in human cirrhotic liver: Relation with nitric oxide. *Journal of Gastroenterology*, 38(9), 854–860. <http://doi.org/10.1007/s00535-003-1161-4>

Yu, D., Zhu, H., Liu, Y., Cao, J., & Zhang, X. (2009). Regulation of proinflammatory cytokine expression in primary mouse astrocytes by coronavirus infection. *Journal of Virology*, 83(23), 12204–14. <http://doi.org/10.1128/JVI.01103-09>

Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M. (2012). Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *The New England Journal of Medicine*, 367(19), 1814–20. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1211721>

Zambrano-Zaragoza, J. F., Romo-Martínez, E. J., Durán-Avelar, M. de J., García-Magallanes, N., & Vibanco-Pérez, N. (2014). Th17 cells in autoimmune and infectious diseases. *International Journal of Inflammation*, 2014, 651503. <http://doi.org/10.1155/2014/651503>

Zanoni, I., Ostuni, R., Marek, L. R., Barresi, S., Barbalat, R., Barton, G. M., Granucci F., & Kagan, J. C. (2011). CD14 Controls the LPS-Induced Endocytosis of Toll-like Receptor 4. *Cell*, 147(4), 868–880. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.051>

Zelus, B. D., Schickli, J. H., Blau, D. M., Weiss, S. R., & Holmes, K. V. (2003). Conformational changes in the spike glycoprotein of murine coronavirus are induced at 37 degrees C either by soluble murine CEACAM1 receptors or by pH 8. *Journal of Virology*, 77(2), 830–40.

Zeremski, M., Petrovic, L. M., & Talal, A. H. (2007). The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatitis*, 14(10), 675–87. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2006.00838.x>



- Zhang, Y., Lian, J.-Q., Huang, C.-X., Wang, J.-P., Wei, X., Nan, X.-P., Yu H.T., Jiang L.L., Wang X.Q., Zhuang Y., Li X.H., Li Y., Wang P.Z., Robek M.D., & Bai, X.-F. (2010). Overexpression of Toll-like receptor 2/4 on monocytes modulates the activities of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in chronic hepatitis B virus infection. *Virology*, 397(1), 34–42. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.007>
- Zhao, L., Rose, K. M., Elliott, R., Van Rooijen, N., & Weiss, S. R. (2011). Cell-type-specific type I interferon antagonism influences organ tropism of murine coronavirus. *Journal of Virology*, 85(19), 10058–68. <http://doi.org/10.1128/JVI.05075-11>
- Zhong, Y., Smart, E. J., Weksler, B., Couraud, P.-O., Hennig, B., & Toborek, M. (2008). Caveolin-1 regulates human immunodeficiency virus-1 Tat-induced alterations of tight junction protein expression via modulation of the Ras signaling. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(31), 7788–96. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0061-08.2008>
- Zhou, H., & Perlman, S. (2007). Mouse hepatitis virus does not induce Beta interferon synthesis and does not inhibit its induction by double-stranded RNA. *Journal of Virology*, 81(2), 568–74. <http://doi.org/10.1128/JVI.01512-06>
- Zhou, H., Zhao, J., & Perlman, S. (2010). Autocrine interferon priming in macrophages but not dendritic cells results in enhanced cytokine and chemokine production after coronavirus infection. *mBio*, 1(4). <http://doi.org/10.1128/mBio.00219-10>
- Zhou, J., Hinton, D. R., Stohlman, S. A., Liu, C.-P., Zhong, L., & Marten, N. W. (2005). Maintenance of CD8+ T cells during acute viral infection of the central nervous system requires CD4+ T cells but not interleukin-2. *Viral Immunology*, 18(1), 162–9. <http://doi.org/10.1089/vim.2005.18.162>
- Zhou, J., Stohlman, S. a., Hinton, D. R., & Marten, N. W. (2003). Neutrophils Promote Mononuclear Cell Infiltration During Viral-Induced Encephalitis. *The Journal of Immunology*, 170(6), 3331–3336. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3331>
- Zhou, J., Stohlman, S. A., Hinton, D. R., & Marten, N. W. (2003). Neutrophils promote mononuclear cell infiltration during viral-induced encephalitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(6), 3331–6.
- Zhou, M., Zhu, X., Ye, S., & Zhou, B. (2014). Blocking TLR2 in vivo attenuates experimental hepatitis induced by concanavalin A in mice. *International Immunopharmacology*, 21(1), 241–6. <http://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.04.027>
- Zhou, W.C., Zhang, Q.B., & Qiao, L. (2014). Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.*, 20(23), 7312-24. <http://doi:10.3748/wjg.v20.i23.7312>.

Zhu, C.-L., Yan, W.-M., Zhu, F., Zhu, Y.-F., Xi, D., Tian, D.-Y., Levy G., Luo X.P., & Ning, Q. (2005). Fibrinogen-like protein 2 fibroleukin expression and its correlation with disease progression in murine hepatitis virus type 3-induced fulminant hepatitis and in patients with severe viral hepatitis B. *World Journal of Gastroenterology* : WJG, 11(44), 6936–40.

Zimmermann, H. W., Seidler, S., Nattermann, J., Gassler, N., Hellerbrand, C., Zerneck, A., Tischendorf J.J., Luedde T., Weiskirchen R., Trautwein C., & Tacke, F. (2010). Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis. *PloS One*, 5(6), e11049. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0011049>

Zimmermann, H.W., Trautwein, C., & Tacke, F. (2012). Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver Injury. *Front Physiol.* , 3, 56. [http://doi: 10.3389/fphys.2012.00056](http://doi:10.3389/fphys.2012.00056)

Zuo, J., Stohlman, S. A., Hoskin, J. B., Hinton, D. R., Atkinson, R., & Bergmann, C. C. (2006). Mouse hepatitis virus pathogenesis in the central nervous system is independent of IL-15 and natural killer cells. *Virology*, 350(1), 206–15. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2006.01.027>

Züst, R., Cervantes-Barragán, L., Kuri, T., Blakqori, G., Weber, F., Ludewig, B., & Thiel, V. (2007). Coronavirus non-structural protein 1 is a major pathogenicity factor: implications for the rational design of coronavirus vaccines. *PLoS Pathogens*, 3(8), e109. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030109>

## **6- ANNEXE I**

**6.1- Article 4 : Pathogenic mouse hepatitis virus or poly(I:C) induce IL-33 in hepatocytes in murine models of hepatitis**

Cet Article a été publié en 2013 dans la revue *PLoS One*  
(PLoS One. 2013 Sep 13;8(9):e74278. doi: 10.1371)

À titre de co-auteur, j'ai participé à la réalisation des infections expérimentales et à la révision de l'article.

**PATHOGENIC MOUSE HEPATITIS VIRUS OR POLY(I:C) INDUCE  
IL-33 IN HEPATOCYTES IN MURINE MODELS OF HEPATITIS**

**Muhammad Imran Arshad<sup>1,2,3,6</sup>, Solène Patrat-Delon<sup>1,2,3</sup>, Claire Piquet-Pellorce<sup>1,2,3</sup>,  
Annie L'Helgoualc'h<sup>1,2,3</sup>, Michel Rauch<sup>1,2,3</sup>, Valentine Genet<sup>1,2,3</sup>, Catherine Lucas-  
Clerc<sup>2,4</sup>, Christian Bleau<sup>5</sup>, Lucie Lamontagne<sup>5</sup>, Michel Samson<sup>1,2,3\*</sup>**

*1 Institut de Recherche Santé Environnement et Travail (IRSET) - U.1085, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Rennes, Bretagne, France, 2 Université de Rennes 1, Rennes, Bretagne, France, 3 Structure Fédérative BioSit UMS 3480 CNRS-US18 Inserm, Rennes, Bretagne, France, 4 Service de Biochimie CHU Rennes, Université de Rennes 1, Rennes, Bretagne, France, 5 Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada, 6 Institute of Microbiology, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan*

**\*Corresponding author**

Dr Michel Samson, Ph.D.  
Université de Rennes 1  
2 avenue Prof Léon Bernard  
Rennes, France

### **6.1.1- Abstract**

The IL-33/ST2 axis is known to be involved in liver pathologies. Although, the IL-33 levels increased in sera of viral hepatitis patients in human, the cellular sources of IL-33 in viral hepatitis remained obscure. Therefore, we aimed to investigate the expression of IL-33 in murine fulminant hepatitis induced by a Toll like receptor (TLR3) viral mimetic, poly(I:C) or by pathogenic mouse hepatitis virus (L2-MHV3). The administration of poly(I:C) plus D-galactosamine (DGalN) in mice led to acute liver injury associated with the induction of IL-33 expression in liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) and vascular endothelial cells (VEC), while the administration of poly(I:C) alone led to hepatocyte specific IL-33 expression in addition to vascular IL-33 expression. The hepatocyte-specific IL-33 expression was down-regulated in NK-depleted poly(I:C) treated mice suggesting a partial regulation of IL-33 by NK cells. The CD1d KO (NKT deficient) mice showed hepatoprotection against poly(I:C)-induced hepatitis in association with increased number of IL-33 expressing hepatocytes in CD1d KO mice than WT controls. These results suggest that hepatocytespecific IL-33 expression in poly(I:C) induced liver injury was partially dependent of NK cells and with limited role of NKT cells. In parallel, the L2-MHV3 infection in mice induced fulminant hepatitis associated with up-regulated IL-33 expression as well as pro-inflammatory cytokine microenvironment in liver. The LSEC and VEC expressed inducible expression of IL-33 following L2-MHV3 infection but the hepatocyte-specific IL-33 expression was only evident between 24 to 32h of post infection. In conclusion, the alarmin cytokine IL-33 was over-expressed during fulminant hepatitis in mice with LSEC, VEC and hepatocytes as potential sources of IL-33.

### **6.1.2- Introduction**

Interleukin-33 (IL-33), a member of IL-1 family also called as IL-1F11, is known to drive immune responses by interaction with its specific receptors ST2 and IL-RAcP [1,2]. The IL-33/ST2 axis is crucially involved in diverse inflammatory and immune mediated pathologies [3,4]. However, limited data is available about the association of IL-33 and ST2 expression in

viral diseases. IL-33 is over-expressed in influenza virus lung infection in mice [5,6] and IL-33 produced by necrotic cells drives protective antiviral CD8<sup>+</sup> T cell responses in lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection in mice [7]. Further, elevated levels of soluble ST2 (sST2) in sera of dengue virus infected patients [8] and HIV infected patients [9] were observed indicating sST2 as potential marker of viral infections. In liver, IL-33/ST2 axis is involved in various viral and immune cell mediated pathologies [10-13]. We initially observed up-regulated expression of IL-33 and ST2 in chronic hepatitis B and C virus (HBV and HCV) infection in human and in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice [14]. The increased level of serum IL-33 and sST2 was observed in acute and chronic hepatic failure in human [15]. Furthermore, elevated IL-33 serum level was also associated with liver damage in patients of chronic hepatitis C virus (HCV) [16] and hepatitis B virus (HBV) [17] infections, representing IL-33 as a possible indicator of viral hepatitis. Despite the fact that IL-33 is proposed to be released as an alarmin in acute inflammatory pathologies [3], the expression and cellular sources of IL-33 during viral fulminant hepatitis in a relevant animal model has not been explored. The polyinosinepolycytidylic acid (Poly(I:C), a synthetic analog of double stranded RNA (dsRNA), induces a moderate acute hepatic injury and mimics a model of viral hepatitis [18,19]. Poly(I:C) activated principally the intrahepatic macrophages (Kupffer cells) and NK cells via TLR3 [20] leading to increase of inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12 and IFN- $\beta$  [18,19,21,22]. A pretreatment with D-galactosamine (DGalN) in Poly(I:C) injected-mice aggravated the acute hepatic injury which become lethal [19]. A natural animal model of viral hepatitis, the mouse hepatitis viruses (MHV), single-strand, positive-sense RNA viruses belonging to *Coronaviridae* family, induced acute and/or chronic hepatitis in mice mimicking human HBV infection and serve as a good tool to study immune dysfunction and cytokines associated with viral acute hepatitis [23,24]. The most hepatotropic serotype of MHV, the mouse hepatitis virus type 3 (MHV3), induced severe fulminant hepatitis in mice and their death within 3-5 days post-infection [25]. In liver, Kupffer cells, NK cells, hepatocytes, sinusoidal endothelial and vascular endothelial cells are the main target cells for MHV3 replication [26,27]. The histopathological lesions in liver were correlated with the levels of inflammatory cytokines [28]. High levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  produced in livers from infected C57BL/6 mice were modulated by TLR receptor. We have previously demonstrated that intrahepatic NK cells decreased after a transient increase in liver from pathogenic L2-

MHV3-infected mice due to virus-induced NK depletion [27]. In the present study, we aimed to investigate the expression and cellular sources of IL-33 in a Poly(I:C)- and L2-MHV3-induced fulminant hepatitis in mice. We found increased expression of IL-33 in liver following Poly(I:C) and L2-MHV3 induced acute hepatitis in mice. The liver sinusoidal endothelial cells, vascular endothelial cells and hepatocytes represent potential sources of IL-33 in Poly(I:C) and murine L2-MHV3 induced fulminant hepatitis. The hepatocyte-specific IL-33 expression in Poly(I:C) induced liver injury was partially dependent of NK cells but not of NKT cells.

### **6.1.3- Material and Methods**

#### **6.1.3.1- Animals**

Wild-type (WT) C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories (St-Constant, QC, Canada) or from Janvier (Le Genest-sur-isle, France). The animals, certified as MHVs free by the manufacturer, were housed under HEPA-filtered air (Forma Scientific, Marietta, OH). The study was conducted in compliance with the regulations of the Comité institutionnel de la Protection des Animaux of the Université du Québec à Montreal (UQAM agreement of L. Lamontagne, No. CIPA= 541), and French laws and the institution's guidelines for animal welfare (agreement of M. Samson #3596). The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the French government (agreement of M. Samson #3596). All efforts were made to minimize suffering".

#### **6.1.3.2- In vivo treatment protocol**

The C57BL/6 (Janvier, France) or CD1d KO mice (a gift of Maria Leite-de-Moraes, Paris) were intravenously injected with 30 µg/mouse of Poly(I:C) (Invivogen) alone or with Dgalactosamine (D-GalN) (SIGMA-G0264) pretreatment at a dose of 15 mg/mouse (i.p). The control mice received similar volume of vehicle in each treatment group. For NK cells depletion experiment, 35 µl of anti-asialo GM1 (anti-ASGM1) polyclonal antibody



(Cerdalane, CL8955) was injected intraperitoneally (i.p) 48 h before D-GalN, Poly(I:C) or combination of both D-GalN Poly(I:C) injections, the control mice received or an equivalent amount of naive rabbit serum. The NK depletion in liver was confirmed by flow cytometry in isolated liver immune cells as described earlier [29]. For MHV3 infection in mice, the C57BL/6 mice (Charles River Laboratories, Canada) were infected by the i.p route with 50% tissue culture infective dose (TCID<sub>50</sub>) of pathogenic L2-MHV3 strain as previously described [25]. Mock-infected or uninfected control mice received a similar volume of RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY). After 16, 24, 28, 39, 48 and 72 h of infection, the mice were anaesthetized by i.p injection using ketamine hydrochloride (200 mg/kg; Vetrepharm Canada Inc., Belleville, ON, Canada) and xylazine (10 mg/kg; Bayer Inc., Toronto, ON, Canada) and euthanized by CO<sub>2</sub> inhalation before liver and blood sampling.

#### **6.1.3.3- Histopathological, biochemical and immunohistochemical analyses**

The histopathological (Hematoxylin And Eosin (H&E) staining) and levels of liver transaminase (ALT/AST) in serum were performed as described earlier [10]. Immunolocalisation of IL-33 was performed by immunohistochemical staining using primary antibody goat IgG anti-mouse-IL-33 (R&D Systems) and secondary HRP-conjugated rabbit anti-goat antibody (Dako, USA) followed by hematoxylin counterstaining in Ventana machine (Ventana Medical Systems, Inc., USA). The counting of IL-33 positive hepatocytes was carried in at least 20 different microscopic fields corresponding to 2.67 mm<sup>2</sup> surface area by using image analysis software (Compix, Inc. HAMAMATSU company, Japan) as previously described [13].

#### **6.1.3.4- RNA isolation and RT-qPCR**

The protocol and conditions for RNA extraction, RT-PCR and qPCR were similar as reported earlier by our laboratory using specific primers for 18S, IL-33, IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  and CXCL1 [10,13]. For the quantification of viral nucleocapsid, the following primer set was used: 5'- TGGAAGGTCTGCACCTGCTA-3' (forward), 5'- TTTGGCCACGGGATTG-3' (reverse). The relative gene expression was normalized

against 18S gene expression. The control mice in each treatment group served as a reference for mRNA expression (control mRNA level was arbitrarily taken as 1).

### **6.1.3.5- Statistical analysis**

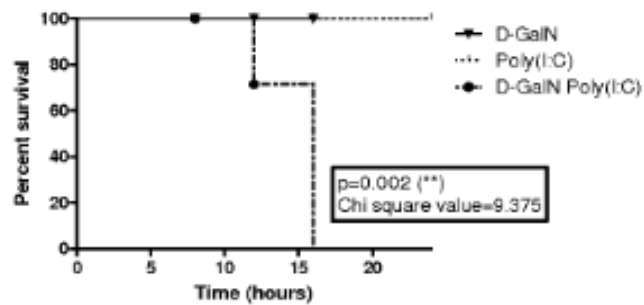
The results are representative of three independent experiments and expressed as means±SEM. Mann-Whitney *U* test was used for comparison of control group parameters with treatment group and multiple group analysis was evaluated by one-way ANOVA with post Mann-Whitney *U* test using GraphPad Prism5 software. For all statistical analyses, p-values <0.05 were considered significant.

### **6.1.4- Results**

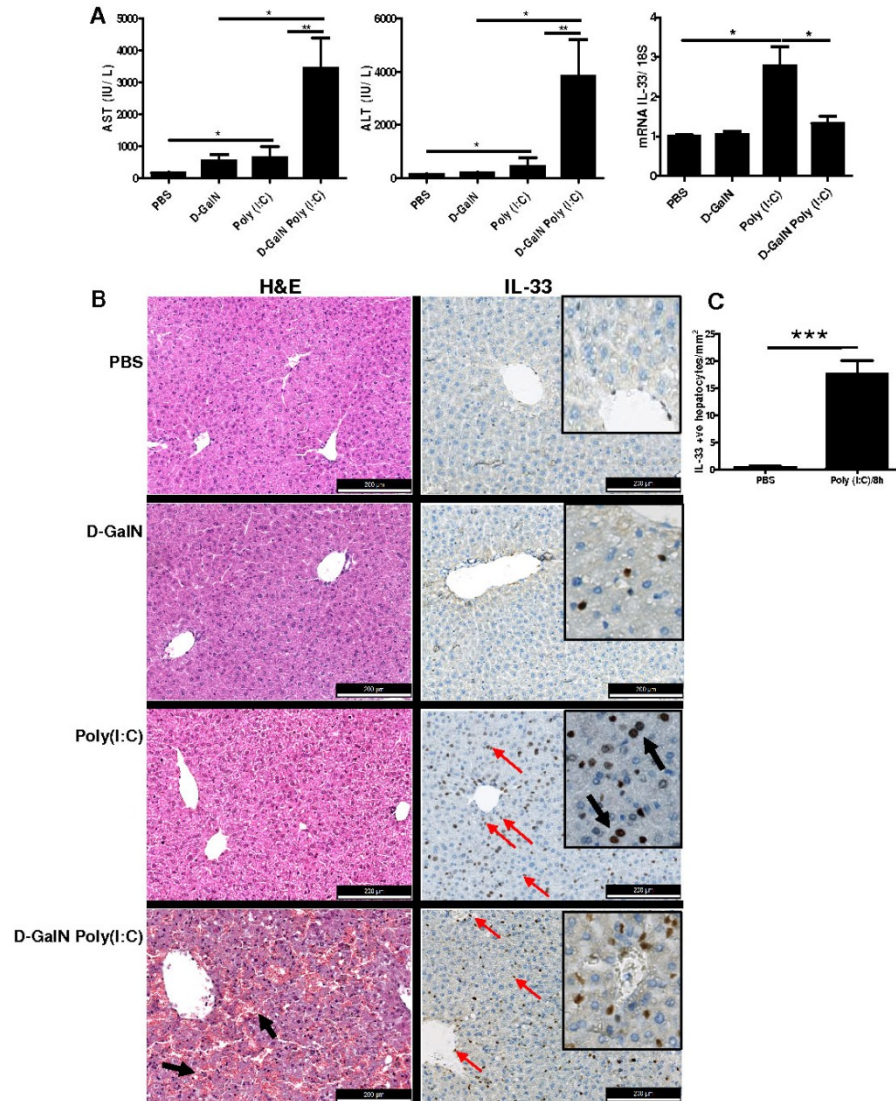
#### **6.1.4.1- Poly(I:C) administration induced acute liver injury in mice with expression of IL-33 in liver**

While the cellular source of IL-33 in viral liver pathology is poorly known in a mouse model, we first aimed to investigate the expression and cellular sources of IL-33 in a Poly(I:C)-induced acute hepatitis. The administration of Poly(I:C) induced moderate liver injury compared to PBS treated mice at 8h, as evident from serum AST/ALT levels (Figure 1A). However, the pre-sensitization of mice with D-galactosamine (D-GalN) led to Poly(I:C)-induced severe liver injury in mice with elevated serum AST/ALT levels at 8h in comparison to D-GalN alone treatment (Figure 1A). The mice treated with combination of D-GalN Poly(I:C) died earlier within 16h compared to D-GalN or Poly(I:C) alone treated mice (Figure S1), therefore, we used 8h time point in this study. The mRNA expression of IL-33 in liver was not significantly increased in Poly(I:C) or D-GalN Poly(I:C) treated mice in comparison with PBS control mice (Figure 1A). The histology of liver tissues revealed increased hemorrhagic lesions in liver after D-GalN Poly(I:C) treatment but less or no marked liver injury in Poly(I:C) or vehicle control mice (Figure 1B). The mRNA expression of IL-33 was significantly increased (2-3 fold) in Poly(I:C) treated mice compared to control mice, however, IL-33 expression was downregulated in D-GalN Poly(I:C) treated mice in

comparison with Poly(I:C) alone (Figure 1A). Regarding cellular sources of IL-33, the liver sinusoidal endothelial cells and vascular endothelial cells expressed IL-33 constitutively in PBS control mice livers and induced expression in these cells was observed following Poly(I:C) and D-GalN Poly(I:C) treatment (Figure 1B). Interestingly, the nuclear expression of IL-33 was found in hepatocytes of Poly(I:C) treated mice (arrows in insert indicate IL-33 positive hepatocytes) but not in D-GalN Poly(I:C) induced liver injury (Figure 1B). The number of IL-33 expressing hepatocytes were clearly and significantly increased in Poly(I:C) induced acute liver injury compared to control mice (Figure 1C). These results suggest that regulation of IL-33 in hepatocytes is associated with Poly(I:C) induced TLR3 stimulation in liver.



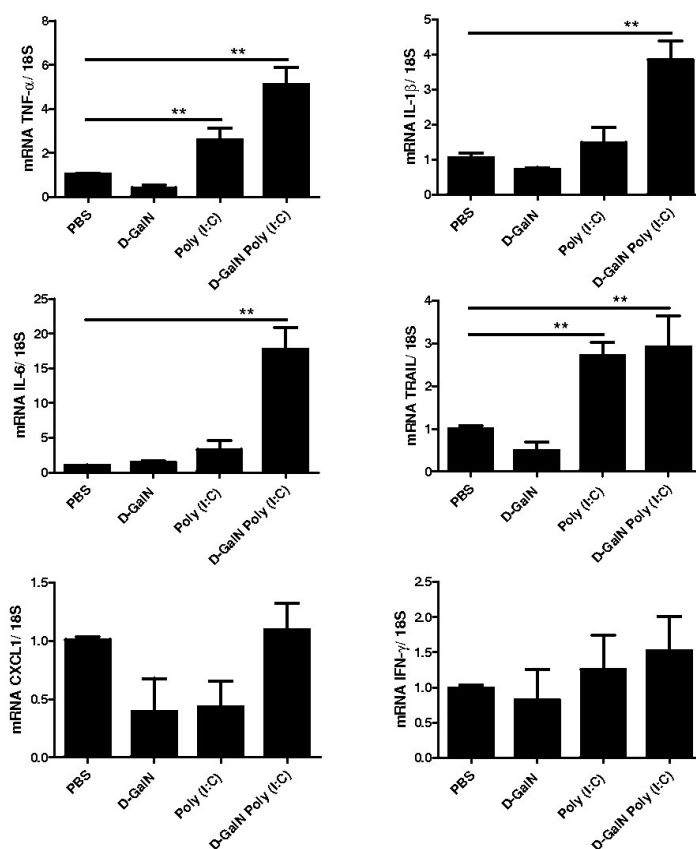
**Figure S1. Survival curve of mice following D-GalN, Poly(I :C) and D-GalN Poly(I :C) treatment.** Survival curve of WT mice (C57Bl/6) treated with D-GalN (15 mg/mouse, i.p.), Poly(I :C) (30  $\mu$ g/mouse i.v.) and combination of D-GalN Poly(I :C). Data were analyzed by Graphpad Prism5 using Log-rank (Mantel-Cox) test.



**Figure 1. Liver injury and IL-33 expression in D-GalN, Poly(I:C), D-GalN Poly(I:C) treated mice.** (A) Levels of serum AST/ALT (IU/L) and relative fold change in mRNA expression of IL-33 in WT mice treated with Poly(I:C) (30  $\mu$ g/mouse i.v.) and/or D-GalN Poly(I:C) at 8h of post injection. (B) Sections of mice liver following PBS, D-GalN, Poly(I:C) and D-GalN Poly(I:C) treatment were stained with H&E for histopathology (arrows indicating hemorrhagic lesions in liver) and for immunolocalisation of IL-33 by using primary antibody goat IgG anti-mouse-IL-33 and secondary HRP-conjugated rabbit anti-goat antibody with hematoxylin counterstaining (black arrows and red arrows indicating IL-33 positive hepatocytes and vascular/sinusoidal endothelial cells, respectively). Scale bar was 200  $\mu$ m. (C) Comparison of number of IL-33 expressing hepatocytes in PBS and Poly(I:C) treated mice at 8h.

#### 6.1.4.2- Poly(I:C)-induced hepatitis up-regulated proinflammatory cytokine expression in liver

The inflammatory cytokines play an important role in development of fulminant hepatitis. Therefore, we investigated the pro-inflammatory cytokine expression in Poly(I:C) and DGalN Poly(I:C) induced acute hepatitis. The transcript level of TNF- $\alpha$ , TRAIL, IL-1 $\beta$  and IL-6 was significantly up-regulated following D-GalN Poly(I:C) induced acute hepatitis (8h) compared to D-GalN or PBS control mice (Figure 2). However, the mRNA expression of IFN- $\gamma$  and CXCL1/KC was not varied between Poly(I:C), D-GalN Poly(I:C) or D-GalN/PBS treated mice (Figure 2).



**Figure 2. Cytokine expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TRAIL, CXCL1, and IFN- $\gamma$  in D-GalN, Poly(I:C), D-GalN Poly(I:C) induced hepatitis mice.** Relative fold change in mRNA expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TRAIL, CXCL1, and IFN- $\gamma$  in livers of Poly(I:C) (30  $\mu$ g/mouse i.v.) and/or D-GalN Poly(I:C) treated mice at 8h of post injection. The PBS-treated mice served as a reference for mRNA expression.

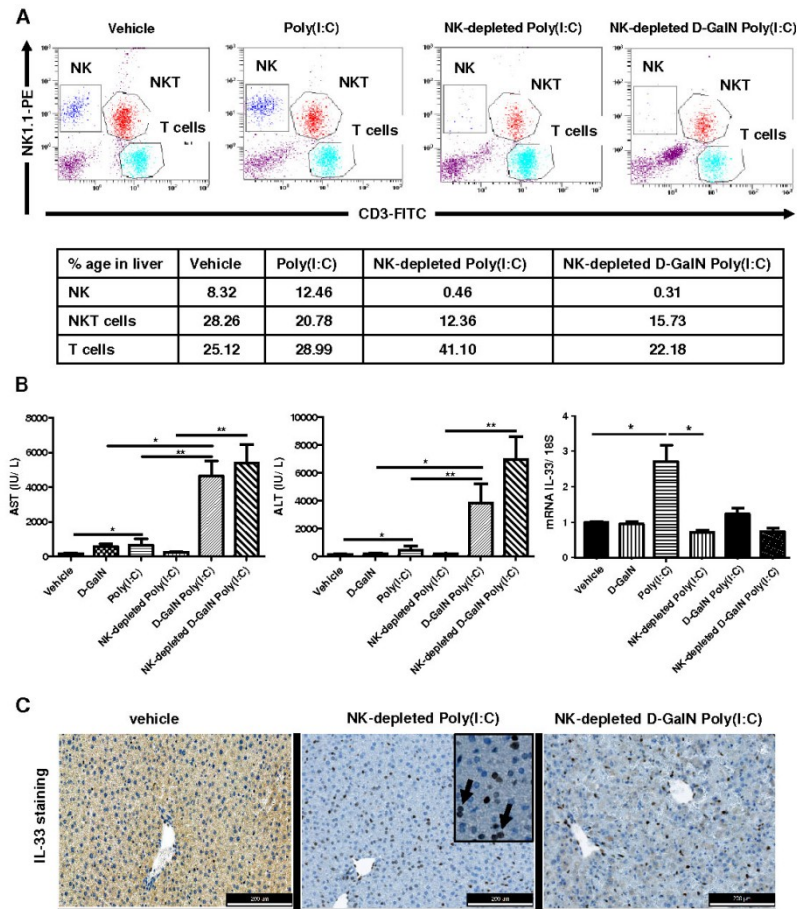
#### **6.1.4.3- NK cells pre-depletion led to severe D-GalN Poly(I:C) induced acute liver injury, increased pro-inflammatory cytokines and down-regulated IL-33 expression in hepatocytes**

NK cells have shown to be crucially important in Poly(I:C) induced liver injury [22]. Here, we studied the effect of depletion of NK cells by anti-ASGM1 antibody on D-GalN Poly(I:C) induced acute hepatitis and expression of IL-33. As expected, the anti-ASGM1 pre-treatment efficiently depleted NK cells in liver of mice compared to vehicle control or Poly(I:C) treated mice (Figure 3A). However, NK cells depletion led to enhanced liver injury (as evaluated by serum AST/ALT) in D-GalN Poly(I:C) treated mice than Poly(I:C) alone or vehicle control mice (Figure 3B). A milder increase in serum transaminases was evident between D-GalN Poly(I:C) and NK-depleted D-GalN Poly(I:C) treated mice (Figure 3B).

The mRNA expression of IL-33 was not varied between control (non NK depleted) and NK-depleted Poly(I:C) or D-GalN Poly(I:C) treated mice although the expression of IL-33 was diminished in NK-depleted D-GalN Poly(I:C) mice (Figure 3B). The liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) and vascular endothelial cells (VEC) expressed IL-33 in NK depleted Poly(I:C) or D-GalN Poly(I:C) treated mice livers and hepatocyte-specific IL-33 expression was evident only after Poly(I:C) treatment (Figure 3C) (arrows indicate IL-33 positive hepatocytes). The NK depletion led to decrease in number of IL-33 expressing hepatocytes in Poly(I:C) treated mice compared to non NK depleted mice (Figure 3D) suggesting a partial NK cells dependent regulation of IL-33 in hepatocytes.

The pro-inflammatory cytokine expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 was up-regulated in Poly(I:C) or D-GalN Poly(I:C) treated mice when compared with control mice ( $p < 0.01$ ) (Figure 3E). NK cell depletion did not decrease the expression level of the inflammatory cytokines (Figure 3E). The mRNA expression of IFN- $\gamma$  was not significantly varied among the treated and control groups of mice except in NK-depleted D-GalN Poly(I:C) treated mice (Figure 3E). The expression of TRAIL was significantly increased in both NK depleted and non depleted mice following Poly(I:C) or D-GalN Poly(I:C) administration when compared with control mice ( $p < 0.01$ ) but significantly decrease in NK depleted mice after D-GalN Poly(I:C) treatment ( $p < 0.05$ ) when compared with D-GalNPolyIC treated mice (Figure 3E).

The expression of CXCL1 only increased in NK depleted D-GalN Poly(I:C) treated mice when compared to control mice ( $p < 0.05$ ) (Figure 3E) that may correlate with development of inflammatory microenvironment in liver and neutrophil migration during liver injury.

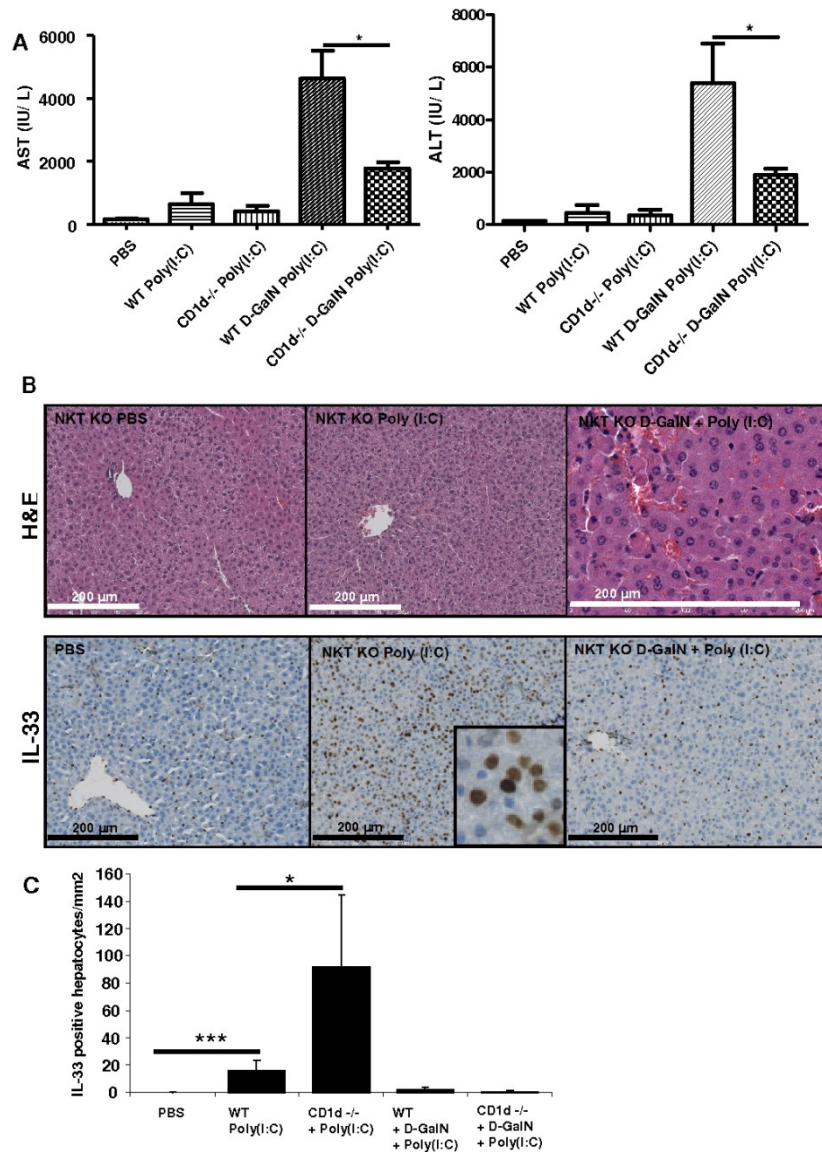


**Figure 3. Liver injury and cytokine expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TRAIL, CXCL1, IFN- $\gamma$  and IL-33 in non NK depleted and NK depleted D-GalN, Poly(I:C), D-GalN Poly(I:C) treated mice. (A)** Pre-depletion (48h before) of NK cells by anti-ASGM1 antibody in mice and confirmation of NK cells percentage by flow cytometry analysis (CD3-FITC and NK1.1-PE markers) in Vehicle (control), Poly(I:C)-, NK-depleted poly(I:C)-, and NK-depleted D-GalN Poly(I:C)-treated mice **(B)** Levels of serum AST/ALT (IU/L) and relative fold change in mRNA expression of IL-33 in NK depleted or not with Poly(I:C) (30  $\mu$ g/mouse i.v.) or D-GalN Poly(I:C)-treated mice at 8h of post injection. **(C)** Immunostaining of IL-33 in livers of NK depleted or not with Poly(I:C) (30  $\mu$ g/mouse i.v.) or D-GalN Poly(I:C) treated mice at 8h of post injection. **(D)** Comparison of number of IL-33 expressing hepatocytes in PBS or Vehicle, Poly(I:C)-treated and NK-depleted Poly(I:C)-treated mice. **(E)** Relative fold change in mRNA expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TRAIL, CXCL1, and IFN- $\gamma$  in livers of NK depleted or not with Poly(I:C) (30  $\mu$ g/mouse i.v.) and/or D-GalN Poly(I:C) treated mice (C57Bl/6) at 8h of post injection.

#### **6.1.4.4- NKT cells deficiency protected mice against Poly(I:C)-induced liver injury but up-regulated hepatocyte-specific IL-33 expression**

The role of NKT cells in Poly(I:C)-induced liver injury is not well known but we have observed a partial decrease in NKT cells percentages in anti-ASGM1-treated mice (Figure 4A). We aimed to verify the impact of NKT cells deficiency in Poly(I:C)-induced liver injury and IL-33 expression in liver in CD1d KO (NKT KO) mice. WT control and NKT KO mice showed increased liver injury (2000 to 5000 AST/ALT levels) after D-GalN Poly(I:C) administration with a milder hepatoprotection in NKT KO mice ( $p < 0.05$ ) when compared with WT treated mice (Figure 4A). Liver histology revealed hemorrhagic lesions in liver after D-GalN Poly(I:C) treatment in NKT KO mice without remarkable liver injury in Poly(I:C) or vehicle control NKT KO mice (Figure 4B, upper panel). The hepatocyte-specific IL-33 expression was evident in Poly(I:C)-administered NKT KO mice but not in D-GalN Poly(I:C)-treated or control NKT KO mice (Figure 4B, lower panel). The number of IL-33 expressing hepatocytes significantly increased in Poly(I:C)-administered NKT KO mice compared to WT controls ( $p < 0.05$ ) but not in D-GalN Poly(I:C)-treated or control NKT KO mice (Figure 4C). These results suggested that NKT cells have a protective effect on liver injury in association with increased expression of IL-33 in hepatocytes during Poly(I:C)-induced liver injury.



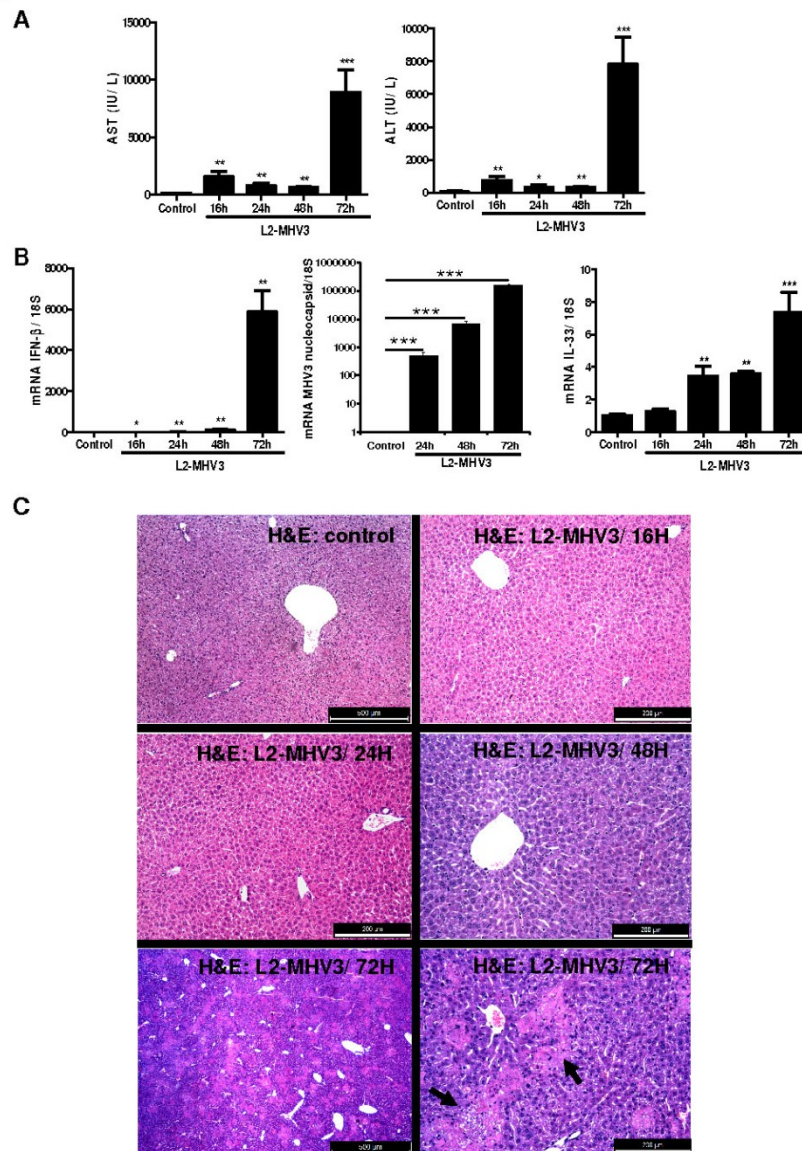


**Figure 4. Liver injury and IL-33 expression in WT and NKT (CD1d) KO mice following Poly(I:C) and D-GalN Poly(I:C) treatment. (A)** Levels of serum AST/ALT (IU/L) in WT and CD1d KO mice following PBS, Poly(I:C) (30  $\mu$ g/mouse i.v.) and/or D-GalN Poly(I:C) treatment at 8h of post injection. **(B)** Liver histology (H and E) and immunostaining of IL-33 in livers of CD1d KO mice treated with PBS, Poly(I:C) and/or D-GalN Poly(I:C). **(C)** Comparison of number of IL-33 expressing hepatocytes in WT and CD1d KO mice following PBS, Poly(I:C) and/or D-GalN Poly(I:C) treatment at 8h of post injection.

#### **6.1.4.5- L2-MHV3 induced fulminant hepatitis in mice was associated with increased expression of IL-33 in liver.**

The pathogenic strain of mouse hepatitis virus (L2-MHV3) induces fulminant hepatitis in C57BL/6 mice [23] and mimics a model of fulminant viral hepatitis (HBV) in human. We investigated the expression and cellular sources of IL-33 in L2-MHV3 induced acute hepatitis in C57BL/6 mice. The kinetics of L2-MHV3 infection in mice exhibited increase in serum AST/ALT levels following 16, 24, 48 and 72h of viral infection with severe and peak liver injury at 72h ( $p < 0.001$ ) (Figure 5A). Accordingly, the liver mRNA expressions of IFN- $\beta$  and nucleocapsid of MHV3 that served as markers of viral infection, increased significantly at 16, 24, 48 and 72h of post infection with peak at 72h (Figure 5B). Interestingly, the mRNA expression of IL-33 was significantly up-regulated following L2-MHV3 infection reaching maximum at 72h post infection ( $p < 0.001$ ) (Figure 5B).

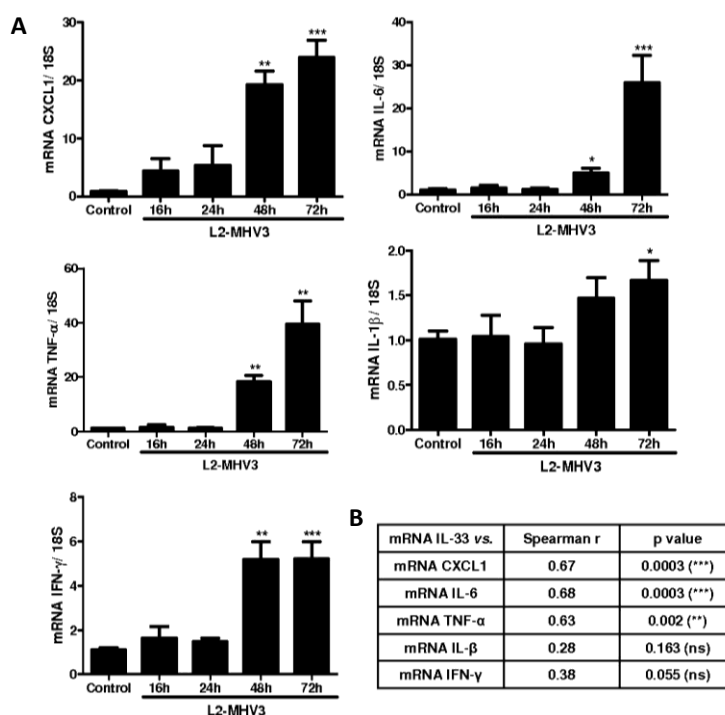
The histology of liver tissues showed important perivascular and parenchymal zone of liver injury at 72h of L2-MHV3 infection compared to vehicle control mice liver and no appreciable liver injury at 16, 24 and 48h time points (Figure 5C). The immunostaining of IL-33 in livers of L2-MHV3 infected mice revealed induced expression of IL-33 in liver sinusoidal endothelial cells, vascular endothelial cells and hepatocytes (Figure 5D). The liver sinusoidal endothelial cells and vascular endothelial cells represented inducible expression of IL-33 at 16, 24, 28, 32, 48 and 72h of L2-MHV3 infection compared to vehicle control mice (Figure 5D). However, the kinetics of hepatocyte-specific IL-33 expression was specifically found at 24, 28 and 32h of L2-MHV3 induced liver injury. In accordance, the number of IL-33 expressing hepatocytes following L2-MHV3 hepatitis increased significantly at 24, 28 and 32h of infection (Figure 5E). Our data showed that IL-33 expression is up-regulated in liver sinusoidal and vascular endothelial cells and hepatocytes during L2-MHV3-induced fulminant hepatitis.



**Figure 5. Liver injury and IL-33 expression in L2-MHV3 induced fulminant hepatitis in mice.** (A) Levels of serum AST/ALT (IU/L) in mice infected with L2-MHV3 ( $10^3$  TCID<sub>50</sub>) or vehicle at 0, 16, 24, 48 and 72h of post infection. (B) Relative fold change in kinetics of mRNA expression of IFN- $\beta$ , nucleocapsid of MHV3 and IL-33 in livers of L2-MHV3 induced hepatitis. (C) Sections of mice liver following vehicle or L2-MHV3 infection (16, 24, 48 and 72h) were stained with H&E for histopathology (arrows indicating zone of liver injury). (D) Immunolocalisation of IL-33 in livers of L2-MHV3 fulminant hepatic tissues by using primary antibody goat IgG anti-mouse-IL-33 and secondary HRP-conjugated rabbit anti-goat antibody with hematoxylin counterstaining (black arrows and red arrows indicating IL-33 positive hepatocytes and vascular/sinusoidal endothelial cells, respectively)). Scale bar was 50  $\mu$ m. (E) Comparison of number of IL-33 expressing hepatocytes in vehicle and L2-MHV3 fulminant hepatic tissues (16, 24 and 32h).

### 6.1.4.6- MHV3 infection in mice up-regulated pro-inflammatory cytokine expression in liver

The inflammatory cytokines play an important role in development of fulminant hepatitis. Therefore, we studied the expression of pro-inflammatory cytokine expression in liver after L2-MHV3 infection. The kinetics of TNF- $\alpha$ , CXCL1, IFN- $\gamma$  and IL-6 showed a similar time dependent increasing trend with peak expression at 72h of L2-MHV3 infection (Figure 6A). The mRNA expression of IL-1 $\beta$  was not greatly increased following L2-MHV3 hepatitis compared to control mice (Figure 6A). A significant correlation between mRNA expression of IL-33 and TNF- $\alpha$ , CXCL1 and IL-6 was evident but not with IL-1 $\beta$  or IFN- $\gamma$  (Figure 6B). Hence, the elevated pro-inflammatory cytokine micro-environment is important for development of L2-MHV3-induced acute hepatitis in mice.



**Figure 6. Cytokine expression of CXCL1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$  in L2-MHV3 induced hepatitis mice. (A)** Relative fold change in kinetics of mRNA expression of CXCL1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$  in liver of L2-MHV3 infected mice at 0, 16, 24, 48 and 72h of post infection. The PBS-treated mice served as a reference for mRNA expression. **(B)** Spearman R correlation of mRNA expression of IL-33 with mRNA expression of CXCL1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$  in liver of L2-MHV3 infected mice.

### 6.1.5- Discussion

The over-expression of IL-33 and ST2 is associated with acute and chronic liver diseases in mice and human. IL-33 and sST2 have shown to be up-regulated in acute on chronic and chronic hepatic failure [15] and in chronic HBV and HCV infections in human [14,16,17]. The cellular sources of IL-33 in viral fulminant hepatitis are not well known. Accordingly, the murine fulminant hepatic models of TLR3 agonist, Poly(I:C), and pathogenic mouse hepatitis virus (L2-MHV3) are relevant acute viral hepatic models in human. Thus, we aimed to know the expression and regulation of IL-33 in Poly(I:C) and L2-MHV3 induced hepatitis in mice. The Poly(I:C) administration in mice induced moderate hepatic injury while co-administration of D-GalN and Poly(I:C) led to very severe fulminant hepatitis in mice. The liver injury induced by D-GalN Poly(I:C) treatment was associated with hemorrhagic lesions in liver and elevated pro-inflammatory cytokines as reported earlier [19,21,22]. The underlying mechanism of Poly(I:C)-induced liver injury is mediated by activation of Kupffer cells and NK cells in a TLR3 dependent pathway [20] in association with increased inflammatory cytokines. Inducible expression of IL-33 was found in liver sinusoidal endothelial cells and vascular endothelial cells following Poly(I:C) and D-GalN Poly(I:C) treatment. However, hepatocyte-specific IL-33 expression was only evident in Poly(I:C) treated mice with increased number of IL-33 expressing hepatocytes compared to control mice. It may be plausible that hepatocyte specific inhibition of transcription by D-GalN prevented hepatocyte-specific IL-33 expression at transcript and protein level following D-GalN Poly(I:C) treatment. However, innate immune stimulation by the TLR3 agonist alone can induce IL-33 expression in liver especially in hepatocytes. The regulation of IL-33 by TLR viral and bacterial ligands have been demonstrated in human corneal epithelial cells and fibroblasts [30,31] as well as in murine macrophages [32]. The IL-33 was up-regulated by Poly(I:C) stimulation in murine macrophages and its transcriptional regulation was dependent of two transcription factors, IFN regulatory factor-3 (IRF-3) and CREB [32]. Here, we add TLR3 mediated expression of IL-33 in liver sinusoidal endothelial cells, vascular endothelial cells and hepatocytes in acute hepatitis in mice in a pathophysiological context. In addition, TLR3 expression is also rapidly increased in liver from L2-MHV3 infected mice (results not shown).

While in a viral murine model, IL-33 has been shown to be expressed by radio-resistant cells of the splenic T cell zone in lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection [7], the above data prompted us to compare the IL-33 expression in a natural viral infection in liver in using the serotype 3 of mouse hepatitis viral infection MHV model [23,25]. We demonstrated the cellular expression of IL-33 in sinusoidal and vascular endothelial cells and hepatocytes at various times of the fulminant viral hepatitis induced by L2-MHV3. The L2-MHV3-induced liver injury was associated with significant increases in serum transaminases ALAT/ASAT, viral nucleocapsid, IFN- $\beta$  and pro-inflammatory cytokine and chimiokine expression. The increased CXCL1 during MHV3 induced acute hepatitis may lead to chemotaxis/infiltration of neutrophils as an early response to liver infection and development of inflammatory microenvironment. The mechanism of MHV3-induced liver injury have shown to be dependent on activation of target cells of virus like Kupffer cells, NK cells, hepatocytes, sinusoidal endothelial and vascular endothelial cells [26,27]. Here we have shown that mRNA expression of IL-33 was over-expressed after L2-MHV3-induced hepatitis in mice. The transcript level of IL-33 was highly increased in L2-MHV3 induced hepatitis than Poly(I:C) treated mice demonstrating a difference between TLR-3 agonist and natural virus infection in liver. TLR3 expression is also rapidly increased in liver from L2-MHV3 infected mice (results not shown), suggesting that another factor may be also involved in the increase of IL-33. The hepatocyte-specific expression of IL-33 in hepatocytes was associated with beginning of L2-MHV3 induced liver injury (24, 28 and 32h) and the inducible expression of IL-33 in liver sinusoidal endothelial cells and vascular endothelial cells was sustained during the whole infection period (16 to 72h).

We next studied the role of NK and NKT cells in Poly(I:C) induced IL-33 expression in liver. The depletion of NK cells by anti-AGSM1 antibody in mice did not inhibit increased liver injury in D-GalN sensitized Poly(I:C) treated mice and had any effect in Poly(I:C) alone administration. These results are contrary to earlier findings which showed that pre-depletion of NK cells protected mice against D-GalN Poly(I:C) induced liver injury [22]. The difference seemed to be related with kinetics and dose of D-GalN Poly(I:C) used in these studies. The significant increase in CXCL1 expression in NK-depleted mice may explain the interplay of immune cells migration in liver i.e. depletion of one immune cell population relatively

compensate the other immune cell population. The major sources of CXCL1 in liver are endothelial cells, Kupffer cells, hepatic stellate cells, hepatocytes and neutrophils and CXCL1 in association with neutrophils is important for development of liver injury [33,34]. The IL-33 expression was induced in liver sinusoidal endothelial cells and vascular endothelial cells. The down-regulation of hepatocyte-specific IL-33 expression in NK depleted mice in Poly(I:C) treated mice suggests a partial regulation of IL-33 by NK cells. Interestingly, IL-33-expressing hepatocytes decreased at the same time than NK cells decreased in liver following L2-MHV3 infection [25], supporting the hypothesis of a regulatory role of NK cells in IL-33 expression in hepatocytes.

In a other relevant murine ConA-induced fulminant hepatic model, we have demonstrated that IL-33 is highly induced in liver especially in hepatocytes and the regulation of hepatocyte-specific IL-33 is dependent of NKT cells and TRAIL [10,13]. In the TLR-3 agonist model used in this study, NKT cells did not control IL-33 expression in Poly(I:C)-induced liver injury because NKT (CD1d) KO mice exhibited increased number of IL-33 expressing hepatocytes than WT controls. These results may suggest a protective role of NKT cells in association with increased hepatocyte-specific IL-33 expression during TLR3-mediated acute hepatitis. We and others have demonstrated such a protective role of NKT cells and IL-33 during ConA-induced liver injury model [12-13] that seems plausible in Poly(I:C)-induced acute liver injury. It has been previously reported that NKT cells did not decrease in liver following L2-MHV3 infection in mice in contrast to that observed with NK cells [25]. However, TRAIL level expression increased in Poly(I:C) treated mice, as previously observed in ConA-induced hepatic model [13].

In conclusion, the cytokine IL-33 is rapidly up-regulated during Poly(I:C) and MHV3-induced fulminant hepatitis in mice, suggesting that IL-33 may act as an alarmin. The liver sinusoidal endothelial cells, vascular endothelial cells and hepatocytes are potential sources of IL-33 during viral fulminant hepatitis and NK cells partially regulate hepatocyte-specific IL-33 expression.

### 6.1.6- References

1. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E et al. (2005) IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23: 479-490. doi:10.1016/j.immuni.2005.09.015
2. Ali S, Huber M, Kollwe C, Bischoff SC, Falk W et al. (2007) IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 18660-18665. doi:10.1073/pnas.0705939104.
3. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB (2010) Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol* 10: 103-110. doi:10.1038/nri2692.
4. Liew FY (2012) IL-33: a Janus cytokine. *Ann Rheum Dis* 71 Suppl 2: i101-i104 doi:10.1136/annrheumdis-2011-200589.
5. Le Goffic R, Arshad MI, Rauch M, L'Helgoualc'h A, Delmas B et al. (2011) Infection with influenza virus induces IL-33 in murine lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45: 1125-1132. doi:10.1165/rcmb.2010-0516OC.
6. Chang YJ, Kim HY, Albacker LA, Baumgarth N, McKenzie AN et al. (2011) Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity. *Nat Immunol* 12: 631-638. doi:10.1038/ni.2045.
7. Bonilla WV, Fröhlich A, Senn K, Kallert S, Fernandez M et al. (2012) The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8(+) T cell responses. *Science* 335: 984-989. doi:10.1126/science.1215418.
8. Becerra A, Warke RV, de Bosch N, Rothman AL, Bosch I (2008) Elevated levels of soluble ST2 protein in dengue virus infected patients. *Cytokine* 41: 114-120. doi:10.1016/j.cyto.2007.11.001.
9. Miyagaki T, Sugaya M, Yokobayashi H, Kato T, Ohmatsu H et al. (2011) High levels of soluble ST2 and low levels of IL-33 in sera of patients with HIV infection. *J Invest Dermatol* 131: 794-796. doi:10.1038/jid.2010.366.
10. Arshad MI, Rauch M, L'Helgoualc'h A, Julia V, Leite-de-Moraes MC et al. (2011) NKT cells are required to induce high IL-33 expression in hepatocytes during ConA-induced acute hepatitis. *Eur J Immunol* 41: 2341-2348. doi:10.1002/eji.201041332.
11. Arshad MI, Piquet-Pellorce C, Samson M (2012) IL-33 and HMGB1 alarmins: sensors of cellular death and their involvement in liver pathology. *Liver Int*, 32: 1200–10.
12. Volarevic V, Mitrovic M, Milovanovic M, Zelen I, Nikolic I et al. (2012) Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A-induced hepatitis. *J Hepatol* 56: 26-33. doi:10.1016/S0168-8278(12)60072-5.



13. Arshad MI, Piquet-Pellorce C, L'Helgoualc'h A, Rauch M, Patrat-Delon S et al. (2012) Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL), but Not FasL and Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ), Regulates Interleukin (IL)-33 Expression in Murine Hepatocytes During Acute Hepatitis. *Hepatology* 56: 2353-2362. doi:10.1002/hep.25893.
14. Marvie P, Lisbonne M, L'Helgoualc'h A, Rauch M, Turlin B et al. (2010) Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *J Cell Mol Med* 14: 1726-1739.
15. Roth GA, Zimmermann M, Lubsczyk BA, Pilz J, Faybik P et al. (2010) Up-regulation of interleukin 33 and soluble ST2 serum levels in liver failure. *J Surg Res* 163: e79-e83. doi:10.1016/j.jss.2010.04.004.
16. Wang J, Zhao P, Guo H, Sun X, Jiang Z et al. (2012) Serum IL-33 levels are associated with liver damage in patients with chronic hepatitis C. *Mediat Inflamm*, 2012: 2012: 819636.
17. Wang J, Cai Y, Ji H, Feng J, Ayana DA et al. (2012) Serum IL-33 Levels Are Associated with Liver Damage in Patients with Chronic Hepatitis B. *J Interferon Cytokine Res* 32: 248-253. doi:10.1089/jir.2011.0109.
18. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732-738. doi:10.1038/35099560.
19. Dejager L, Libert C (2008) Tumor necrosis factor alpha mediates the lethal hepatotoxic effects of poly(I:C) in D-galactosamine-sensitized mice. *Cytokine* 42: 55-61. doi:10.1016/j.cyto.2008.01.014.
20. Cavanaugh PF Jr., Ho YK, Bardos TJ (1996) The activation of murine macrophages and natural killer cells by the partially thiolated double stranded RNA poly(I)-mercapto poly(C). *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 91: 131-147.
21. Schwabe RF, Seki E, Brenner DA (2006) Toll-like receptor signaling in the liver. *Gastroenterology* 130: 1886-1900. doi:10.1053/j.gastro.2006.01.038.
22. Hou X, Zhou R, Wei H, Sun R, Tian Z (2009) NKG2D-retinoic acid early inducible-1 recognition between natural killer cells and Kupffer cells in a novel murine natural killer cell-dependent fulminant hepatitis. *Hepatology* 49: 940-949. doi:10.1002/hep.22725.
23. Lamontagne L, Descoteaux JP, Jolicoeur P (1989) Mouse hepatitis virus 3 replication in T and B lymphocytes correlate with viral pathogenicity. *J Immunol* 142: 4458-4465.
24. Aparicio JL, Peña C, Retegui LA (2011) Autoimmune hepatitis-like disease in C57BL/6 mice infected with mouse hepatitis virus A59. *Int Immunopharmacol* 11: 1591-1598. doi:10.1016/j.intimp.2011.05.020.

25. Jacques A, Bleau C, Martin JP, Lamontagne L (2008) Intrahepatic endothelial and Kupffer cells involved in immunosuppressive cytokines and natural killer (NK)/NK T cell disorders in viral acute hepatitis. *Clin Exp Immunol* 152: 298-310. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03628.x.
26. Godfraind C, Langreth SG, Cardellichio CB, Knobler R, Coutelier JP et al. (1995) Tissue and cellular distribution of an adhesion molecule in the carcinoembryonic antigen family that serves as a receptor for mouse hepatitis virus. *Lab Invest* 73: 615-627.
27. Lehoux M, Jacques A, Lusignan S, Lamontagne L (2004) Murine viral hepatitis involves NK cell depletion associated with virus-induced apoptosis. *Clin Exp Immunol* 137: 41-51. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02501.x.
28. Jacques A, Bleau C, Turbide C, Beauchemin N, Lamontagne L (2009) Macrophage interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha are induced by coronavirus fixation to Toll-like receptor 2/heparan sulphate receptors but not carcinoembryonic cell adhesion antigen 1a. *Immunology* 128: e181-e192. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02946.x.
29. Lisbonne M, L'Helgoualc'h A, Nauwelaers G, Turlin B, Lucas C et al. (2011) Invariant natural killer T-cell-deficient mice display increased CCl(4) -induced hepatitis associated with CXCL1 over-expression and neutrophil infiltration. *Eur J Immunol* 41: 1720-1732. doi:10.1002/eji.201041006.
30. Zhang L, Lu R, Zhao G, Pflugfelder SC, Li DQ (2011) TLR-mediated induction of pro-allergic cytokine IL-33 in ocular mucosal epithelium. *Int J Biochem Cell Biol* 43: 1383-1391. doi:10.1016/j.biocel.2011.06.003.
31. Sponheim J, Pollheimer J, Olsen T, Balogh J, Hammarström C et al. (2010) Inflammatory bowel disease-associated interleukin-33 is preferentially expressed in ulceration-associated myofibroblasts. *Am J Pathol* 177: 2804-2815. doi:10.2353/ajpath.2010.100378.
32. Polumuri SK, Jayakar GG, Shirey KA, Roberts ZJ, Perkins DJ et al. (2012) Transcriptional Regulation of Murine IL-33 by TLR and Non-TLR Agonists. *J Immunol*, 189: 50-60.
33. Stefanovic L, Brenner DA, Stefanovic B (2005) Direct hepatotoxic effect of KC chemokine in the liver without infiltration of neutrophils. *Exp Biol Med (Maywood)* 230: 573-586.
34. Patrick AL, Rullo J, Beaudin S, Liaw P, Fox-Robichaud AE (2007) Hepatic leukocyte recruitment in response to time-limited expression of TNF-alpha and IL-1beta. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G663-G672. doi:10.1152/ajpgi.00070.2007.