

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Delphin BARBE

Thèse dirigée par **Alain DUPERRAY**

préparée au sein du **Laboratoire INSERM/UJF U823, Institut Albert Bonniot - Equipe Immunologie Analytique des Pathologies Chroniques**
dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Rôle des rétrovirus endogènes humains dans l'inflammation de l'endothélium vasculaire.

Thèse soutenue publiquement le **19 Novembre 2012**,
devant le jury composé de :

Pr Jean KANELLOPOULOS

Professeur émérite, Université Paris-Sud, Rapporteur.

Dr Dimitri LAVILLETTE

CR, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Rapporteur.

Pr José BOUCRAUT

MCU-PH, Université de la Méditerranée, Hôpital de la Conception, Marseille,
Examineur.

Dr Alain DUPERRAY

DR, Institut Albert Bonniot INSERM/UJF U823, La tronche, Examineur,
directeur de thèse.

Pr Patrice MORAND

PU PH, CHU de Grenoble, Examineur, Président du jury.



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Alain Duperray pour avoir accepté de diriger cette thèse, pour ses conseils techniques et scientifiques ainsi que pour la relecture de ce manuscrit. De la même façon, je tiens à remercier Patrice Marche pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour ses conseils scientifiques avisés. Enfin, je remercie également Christian Villiers, Hei-Lanne Reynaud-Dougier et Gilda Raguenez pour leur support technique.

Sur un plan plus personnel, je souhaite remercier mes parents et ma sœur pour avoir supporté quelques sautes d'humeur de ces 3 dernières années...

Je remercie Fabio pour m'avoir souvent permis d'avoir ma dose de grand air et d'adrénaline en en montagne...

Je remercie Xavier pour m'avoir permis de me changer les idées grâce à sa bonne humeur et à sa poisse légendaire...

Enfin je remercie Jérémie pour m'avoir aidé à surmonter pendant 3 ans la dure épreuve imposée par la cuisine des restaurants universitaires.

Résumé

Le MSR/V (Multiple Sclerosis Associated Retro Virus) fait partie de la famille de rétrovirus endogènes humains HERV-W. Une protéine d'enveloppe provenant du MSR/V est retrouvée chez la plupart des patients atteints de sclérose en plaques (SEP). Cette protéine (Env-ms) a des propriétés pro-inflammatoires sur les cellules immunitaires et pourrait donc jouer un rôle dans la pathogenèse de la SEP en exacerbant la diapédèse leucocytaire observée dans le système nerveux central (SNC) des patients. Cette étude vise principalement à analyser les effets de Env-ms sur la barrière hémato-encéphalique (BHE) au niveau moléculaire et fonctionnel.

Nous avons pu démontrer que l'enveloppe recombinante du MSR/V était capable de stimuler plusieurs paramètres inflammatoires sur un modèle humain de BHE *in vitro*, la lignée HCMEC/D3. En effet, Env-ms induit une surexpression d'ICAM-1, une protéine impliquée dans l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales, d'une manière dose dépendante ainsi qu'une production dose dépendante de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et l'IL-8. De plus, par une approche utilisant des siRNAs, nous avons pu montrer que Env-ms était reconnue par le récepteur TLR4, un récepteur de l'immunité innée exprimé par les cellules endothéliales. Nous avons aussi montré par des essais fonctionnels que Env-ms stimulait de manière significative l'adhésion de cellules immunitaires activées à la monocouche de cellules endothéliales.

Enfin, nous avons aussi mesuré les effets de Env-ms sur des cultures primaires de cellules endothéliales HUVEC et nous avons pu montrer que les propriétés pro-inflammatoires de la protéine d'enveloppe étaient similaires à celles observées sur le modèle HCMEC/D3

Ces résultats appuient l'hypothèse selon laquelle le MSR/V pourrait être impliqué dans la pathogenèse de la SEP ou bien dans le maintien d'un niveau d'inflammation élevé favorisant le désordre immunitaire observé chez les patients. Le MSR/V pourrait également jouer un rôle dans d'autres maladies inflammatoires chroniques.

Abstract

The MSRV (Multiple Sclerosis Associated Retro Virus) belongs to the human endogenous retrovirus HERV-W family. An envelope protein originating from the MSRV was found in most patients with multiple sclerosis (MS). This protein (Env-ms) has pro-inflammatory properties on several immune cells and could therefore play a role in the MS pathogenesis by promoting the leukocyte diapedesis observed in the central nervous system of patients. Our study aims to analyze the effects of Env-ms on the blood-brain barrier (BBB) at a molecular and functional level.

We have demonstrated that the recombinant MSRV envelope was able to strongly stimulate several inflammatory parameters on a human BBB *in vitro* model, the HCMEC/D3 cell line. Indeed, Env-ms induced overexpression of ICAM-1, a major mediator of leukocyte adhesion to endothelial cells, in a dose-dependent manner and a strong dose-dependent production of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8. Furthermore, using a silencing approach with siRNAs, we have shown that Env-ms was recognized via the TLR4 receptor, a pattern recognition receptor of innate immunity present on endothelial cells. Indeed, the knock down of TLR4 abolishes the pro-inflammatory effects of Env-ms. We have also shown using functional assays, that the treatment of brain endothelial cells with Env-ms significantly stimulated the adhesion of activated immune cells to the monolayer of endothelial cells.

We also assessed the effects of Env-ms on primary endothelial cells HUVECs and we observed that the pro-inflammatory properties of the envelope protein were similar to those observed on HCMEC/D3.

These findings support the hypothesis that MSRV could be involved in the pathogenesis of MS disease or at least in maintenance of inflammatory conditions thus fueling the autoimmune disorder. The MSRV could also play a role in other chronic inflammatory diseases.

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	4
Abstract	5
Table des matières	6
Liste des figures	11
Liste des abréviations	14
Chapitre 1 : Introduction	18
1.1. Les rétrovirus endogènes.....	18
1.1.1. Les rétrovirus endogènes humains (HERV).....	18
1.1.2. HERVs et leur implication dans certaines pathologies.	21
1.1.3. Le MSR/V : Multiple Sclerosis associated Retro Viral element.....	22
1.1.4 Les propriétés de l'enveloppe du MSR/V	25
1.1.4.1. L'enveloppe du MSR/V exerce une activité de type superantigène.....	26
1.1.4.2. L'enveloppe du MSR/V exerce des propriétés pro-inflammatoires sur certaines cellules immunitaires.....	28
1.2. La sclérose en plaques.....	29
1.2.1. Etiologie	30
1.2.2. Physiopathologie	34
1.2.3. Traitements.....	34
1.3. L'endothélium vasculaire.....	35
1.3.1. Généralités.....	36
1.3.2. Le cas particulier de la barrière hémato-encéphalique.....	38
1.3.3. Les modèles in vitro d'endothélium.....	40
1.3.3.1. Un modèle de barrière hémato-encéphalique : les cellules HCMEC/D3.....	40

1.3.3.2. Un modèle d'endothélium « classique » : Les HUVEC	42
1.4. Le système immunitaire	42
1.4.1. Le système immunitaire inné	43
1.4.1.1. Les récepteurs de type toll (TLRs).....	43
1.4.1.2. Le récepteur TLR4.....	45
1.4.2. Le système immunitaire adaptatif	48
1.5. Endothélium et inflammation.....	49
1.5.1. Cytokines et cellules endothéliales	49
1.5.2. La migration trans-endothéliale (diapédèse)	51
1.7. Objectifs de la thèse	54
Chapitre 2 : Matériel et méthodes	57
2.1. Protéines d'enveloppes recombinantes	57
2.1.1. Enveloppe du MSRV (Env-ms)	57
2.1.2. Enveloppe HERVWE1 (Env-syn ou syncytine)	59
2.1.3. Anticorps anti-enveloppe	59
2.2. Cellules est conditions de culture.....	60
2.2.1. Cellules HCMEC/D3.....	60
2.2.2. Cellules HUVECs	60
2.2.3. Cellules HL-60	61
2.3. Essais de stimulation	61
2.4. Dosage des cytokines (ELISA)	61
2.5. Tests d'adhésion	62
2.6. Immuno-marquages et cytométrie en flux	62
2.7. Immuno-marquages et microscopie de fluorescence	63
2.8. SDS-PAGE et Western blots.....	65

2.7.1. Extraction des protéines totales.....	65
2.7.2. SDS-PAGE.....	66
2.7.3. Transfert et immuno-révélation.....	66
2.9. siRNAs et transfections.....	67
2.10. Transfections par électroporation.....	67
Chapitre 3 : Résultats	70
3.1. Effets inflammatoires des enveloppes rétrovirales.....	70
3.1.1. Effets des protéines recombinantes sur le modèle HCMEC/D3	70
3.1.1.1. <i>Caractéristiques générales du modèle HCMEC/D3</i>	70
3.1.1.2. <i>Analyse de l'expression d'ICAM-1 en réponse aux enveloppes</i>	74
3.1.1.3. <i>Tests fonctionnels : Effets de Env-ms sur les phénomènes d'adhésion</i>	75
3.1.1.4. <i>Analyse de la production de cytokines en réponse aux enveloppes</i>	77
3.1.1.5. <i>Spécificité d'action de l'enveloppe du MSRV sur les HCMEC/D3</i>	79
3.1.2. Effet des protéines d'enveloppe transfectées sur le modèle HCMEC/D3	82
3.1.2. Effets des protéines recombinantes Env-ms et Env-syn sur le modèle HUVEC ...	85
3.1.2.1. <i>Analyse de l'expression d'ICAM-1 en réponse aux enveloppes</i>	86
3.1.2.2. <i>Analyse de la production de cytokines en réponse aux enveloppes</i>	87
3.2. Voies de signalisation impliquées dans les mécanismes d'action de l'enveloppe du MSRV.....	89
3.2.1. Le rôle du corécepteur CD14	89
3.2.2. Présence du récepteur TLR4 sur les cellules endothéliales.....	91
3.2.3. <i>Knock down</i> du récepteur TLR4 sur les HCMEC/D3	94
3.2.4. Effet du <i>Knock down</i> de TLR4 sur la réponse inflammatoire à Env-ms.....	97
3.2.4.1. <i>Effet du Knock down sur la surexpression d'ICAM-1 induite par Env-ms</i>	97
3.2.4.1. <i>Effet du Knock down sur la production de cytokines induite par Env-ms</i>	98

Chapitre 4 : Discussion	102
4.1. Effets inflammatoires et spécificité d'action sur le modèle HCMEC/D3	102
4.3. Effets inflammatoires sur le modèles HUVEC	104
4.3. Effets des transfections des enveloppes rétrovirales dans les HCMEC/D3	105
4.3. Etude fonctionnelle des effets de l'enveloppe du MSR.V sur les phénomènes d'adhésion.	106
4.4. Expression du récepteur TLR4 par les cellules endothéliales.....	109
4.5. Le <i>Knock down</i> de TLR4 et ses effets.....	111
4.6. Activité pro-inflammatoire de l'enveloppe, quels sont les mécanismes à l'origine de ce phénomène ?.....	112
Chapitre 5 : Conclusion / perspectives	116
Bibliographie.....	120

Liste des figures

1.1	Arbre évolutif des rétrovirus endogènes humains	18
1.2	Localisation génomique des séquences homologues à l'enveloppe du MSR/V	19
1.3	Mécanismes théoriques du rôle des rétrovirus endogènes dans certaines pathologies	21
1.4	Alignement de la séquence de l'enveloppe du MSR/V avec la syncytine	23-24
1.5	Représentation schématique de la liaison d'un super-antigène entre le TCR et le CMH	26
1.6	Modèle de H. Perron pour le rôle des HERV dans la sclérose en plaque	32
1.7	Schéma des protéines des jonctions adhérentes et des jonctions serrées	36
1.8	Schéma de la BHE	38
1.9	Expression des différentes protéines de jonction par le modèle HCMEC/D3	40
1.10	Les différents TLRs, leurs ligands et les voies de signalisation mises en jeu	44
1.11	Expression et signalisation du TLR4	46
1.12	Etapes de capture d'un leucocyte par l'endothélium avant et pendant la diapédèse	51
2.1	Représentation schématique de la protéine d'enveloppe du MSR/V	56
2.2	Analyse par SDS-PAGE et par spectrométrie de masse de la protéine recombinante Env-ms purifiée	58
3.1	Immuno-marquage des protéines de jonction PECAM-1, VE-cadhérine, ZO-1 et Claudine-3 et contraste de phase sur les HCMEC/D3	70
3.2	Analyse de l'expression d'ICAM-1 sur HCMEC/D3 par cytométrie en flux et microscopie après traitement au TNF- α	72
3.3	Analyse de l'expression d'ICAM-1 sur HCMEC/D3 par cytométrie en flux et microscopie après traitement par les enveloppes recombinantes	74
3.4	Test d'adhésion HCMEC/D3 - HL-60	75
3.5	Analyse par ELISA de la production d'IL-6 par les HCMEC/D3 après traitement par les enveloppes recombinantes	76
3.6	Analyse par ELISA de la production d'IL-8 par les HCMEC/D3 après traitement par les enveloppes recombinantes	77

3.7	Analyse par ELISA de la production de TNF- α par les HCMEC/D3 après traitement par les enveloppes recombinantes	78
3.8	Tests d'inhibition par des anticorps monoclonaux	80
3.9	Test d'inhibition par la polymyxine B	81
3.10	HCMEC/D3 observées en contraste de phase après transfection par les enveloppes rétrovirales	82
3.11	Immunofluorescence après marquage de la protéine d'enveloppe sur des HCMEC/D3 transfectées par Env-ms	83
3.12	Analyse par cytométrie en flux de l'expression de l'enveloppe et de l'expression d'ICAM-1 par HCMEC/D3 après transfection	84
3.13	Analyse par cytométrie en flux de l'expression d'ICAM-1 par les HUVECs après traitement par les enveloppes recombinantes	85
3.14	Analyse par ELISA de la production d'IL-8 par les HUVECs après traitement par les enveloppes recombinantes	86
3.15	Analyse par ELISA de la production d'IL-6 par les HUVECs après traitement par les enveloppes recombinantes	87
3.16	Analyse de l'expression d'ICAM-1 sur les HCMEC/D3 en réponse au LPS en conditions normales ou sans sérum	89
3.17	Analyse par Western Blot de l'expression de TLR4 sur HUVEC et HCMEC	91
3.18	Immunofluorescence et analyse de la co-localisation entre TLR4 et appareil de Golgi sur les HCMEC/D3	92
3.19	Analyse par Western blot de l'expression de TLR4 par les HCMEC/D3 après <i>Knock down</i> de TLR4	94
3.20	Analyse de l'expression d'ICAM-1 et de la production d'IL-8 par les HCMEC/D3 en réponse au LPS et au TNF- α après <i>Knock down</i> de TLR4	95
3.21	Analyse de l'expression d'ICAM-1 par les cellules HCMEC/D3 en réponse à Env-ms et au LPS après <i>Knock down</i> de TLR4	97
3.22	Analyse par ELISA de la production de cytokines IL-6 et IL-8 par les HCMEC/D3 en réponse à Env-ms et au LPS après <i>Knock down</i> de TLR4	98
4.1	Schéma montrant l'activité superantigène du MMTV et son importance dans le cycle de vie du virus.	113
5.1	Schéma résumé des résultats de l'étude et intégration dans le modèle de H. Perron	118

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ALCAM	Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BCR	B Cell Receptor
bFGF	basal Fibroblast Growth Factor
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster de Différenciation
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CRP	C Reactive Protein
CSF	Cerebro-Spinal Fluid
E.coli	Escherichia. coli
EBM-2	Endothelial Basal Medium-2
EBNA	Epstein-Barr Nuclear Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESAM	Endothelial Selective Adhesion Molecule
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FSC	Forward Scatter
Gag	Group Antigens
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
HCMEC/D3	Human Cerebral Microvascular Endothelial Cells
HERV	Human Endogenous Retrovirus
HHV-6	Human Herpes Virus
HL-60	Human promyelocytic Leukemia cells - 60

HLA	Human Leucocyte Antigen
HRP	Horseradish Peroxidase
HSV-1	Herpes Simplex Virus - 1
hTERT	Human Telomerase Reverse Transcriptase
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule - 1
Ig	Immunoglobuline
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukine
IPTG	Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranoside
IRF3	Interferon Regulatory Factor 3
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
JAM	Junctional Adhesion Molecule
kDa	kilo Dalton
KO	Knock Out
LAL	Limulus Amebocytes Lysate
LFA-1	Lymphocyte Function-associated Antigen - 1
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine Rich Regions
LTR	Long Terminal Repeats
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein 1
MD-2	Myeloid Differentiation factor 2
ME	Mercaptoethanol
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MIs	Minor Lymphocyte Stimulating antigen
MMP	Matrix Metalloproteinase
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
MS	Multiple Sclerosis
MSRV	Multiple Sclerosis Retroviral element
Myd88	Myeloid differentiation primary-response protein 88
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
NLR	NOD Like Receptor
NOD	Nucleotide Oligomerization Domain
PAMP	Pathogen Associated molecular Pattern
PBMC	Peripheral Blood Monocytic Cells

PBS	Phosphate Buffered Saline
CMV	CytomégaloVirus
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule - 1
PP-MS	Primary Progressive - Multiple Sclerosis
PRR	Pattern Recognition Receptor
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RR-MS	Relapsing Remiting - Multiple Sclerosis
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEP	Sclérose En Plaque
siRNA	Small Interfering Ribonucleic Acid
SNC	Système Nerveux Central
SP-MS	Secondary Progressive - Multiple Sclerosis
SSC	Side Scatter
SU	Surface Unit
SV40	Simian vacuolating Virus 40
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TCR	T Cell Receptor
TEER	Transendothelial Electrical Resistance
Th	Lymphocyte T helper
TIR	Toll/IL-1 Receptor
TLR	Toll Like Receptor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
TRAM	TRIF Related Adaptor Molecule
TRIF	TIR domain containing adapter inducing interferon beta
TRITC	Tetra methyl Rhodamine Iso Thio Cyanate
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule - 1
VE-cadhérine	Vascular Endothelial cadhérine
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLA-4	Very Late Antigen - 4
ZO	Zonula Occludens

Chapitre 1 : Introduction

1.1. Les rétrovirus endogènes.

Les rétrovirus endogènes sont constitués de séquences d'ADN qui se sont intégrées de façon stable au génome de l'hôte au cours de l'évolution d'une espèce donnée. En effet, lors d'une infection par une particule rétrovirale, cette dernière est capable de rétro-transcrire son génome constitué d'ARN afin de l'intégrer sous forme d'ADN à celui de la cellule infectée pour pouvoir ensuite se servir de la machinerie de transcription / traduction de l'hôte et ainsi se répliquer. Si l'événement d'intégration survient lors de l'infection d'une cellule germinale, et si l'hôte survit, la séquence d'ADN rétrovirale pourra être transmise à la descendance et devenir *de facto* un rétrovirus endogène.

1.1.1. Les rétrovirus endogènes humains (HERV)

Chez l'espèce humaine, on estime qu'environ 8% de la totalité du génome provient de l'infection de la lignée germinale par des rétrovirus au cours de l'évolution [1, 2]. Ces éléments issus de l'intégration stable de séquences rétrovirales sont appelés rétrovirus endogènes humains (acronyme anglais : HERV pour Human Endogenous Retrovirus). La structure générale d'un rétrovirus endogène est la même que celle d'un rétrovirus exogène infectieux puisqu'on retrouve les séquences *gag*, codant pour des protéines de structure ; *pol*, codant pour les enzymes rétrovirales, en particulier la reverse transcriptase (RT) nécessaire à la rétro-transcription de l'ARN rétroviral en ADN avant son intégration au génome de la cellule hôte, et *env* ; codant pour les protéines d'enveloppes nécessaires à la fusion du rétrovirus avec la cellule cible. Ces séquences sont flanquées par les régions LTR (Long Terminal Repeats) contenant des éléments régulateurs.

Il existe plusieurs familles d'éléments HERV qui sont le plus souvent désignés par HERV-X, X représentant le code à une lettre de l'acide aminé amené par un ARN de transfert au site d'initiation de la traduction. Les diverses séquences endogènes des HERV résultent d'intégration dans le génome des primates au cours de leur évolution depuis environ 70

millions d'années (Figure 1.1). Les HERV-W apparaissent il y a environ 40 millions d'années et se retrouvent dans le génome des singes africains et leurs descendants mais sont absents des singes américains (Figure 1.1). La plupart de ces éléments ont été rendus inactifs au cours de l'évolution, principalement par l'apparition de mutations comme des ou des insertions / délétions dans les séquences rétrovirales. Cependant certaines séquences ont conservé des cadres de lectures ouverts et pourraient donc avoir un rôle physiologique pour l'hôte. On connaît en particulier un élément de la famille HERV-W codant pour une protéine appelée syncytine impliquée dans la formation du syncytiotrophoblaste au cours du développement du placenta [3, 4]. Cette protéine transmembranaire est capable d'induire la fusion des membranes de cellules adjacentes en interagissant avec ASCT-1 et 2, des transporteurs d'acides aminés ubiquitaires [3, 5]. La syncytine est codée par le locus ERVWE1 qui est donc devenu au cours de l'évolution un gène à part entière dont l'expression est finement contrôlée au cours du développement du placenta [6-8].

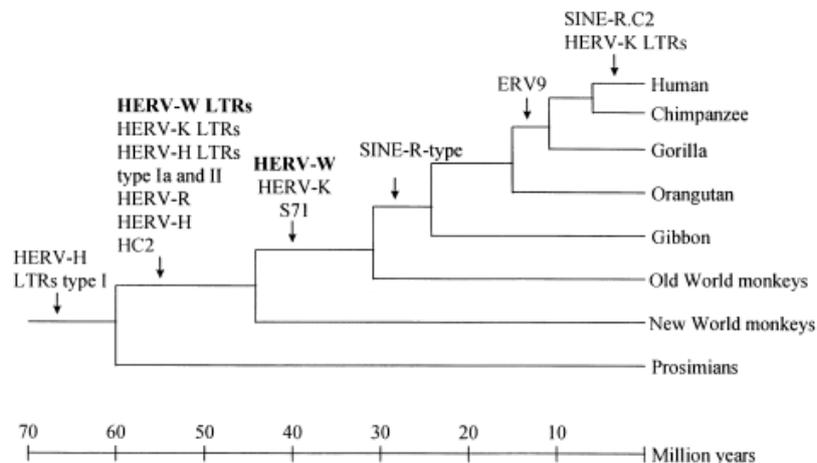


Figure 1.1. Arbre évolutif des rétrovirus endogènes chez les primates présentant une estimation de leur date d'intégration. D'après Kim et al. 1999 [9]

L'analyse des localisations génomiques des éléments HERV-W endogènes montre que des séquences ayant une forte identité avec la séquence consensus de la protéine d'enveloppe de cette famille (AF331500) sont retrouvées dans plusieurs chromosomes humains (Figure 1.2.A) grâce à l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Il est d'ailleurs intéressant de

remarquer que plusieurs séquences partageant un fort pourcentage d'identité avec l'enveloppe du MSRV se trouvent sur le chromosome X (Figure 1.2.B), ce qui pourrait être mis en lien avec le fait que la SEP touche une plus grande proportion d'individus de sexe féminin [10].

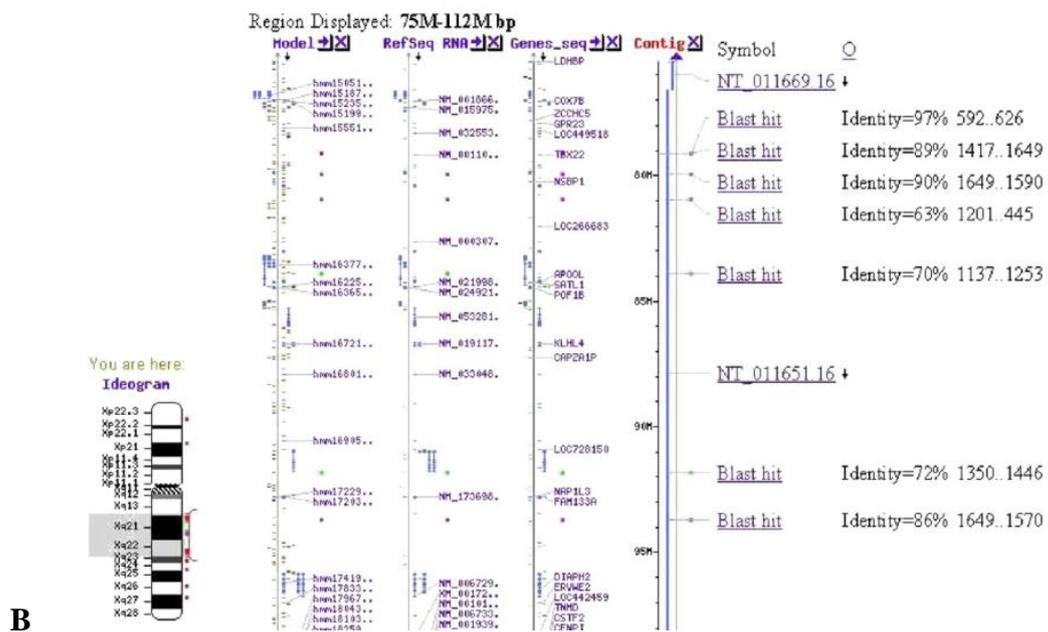
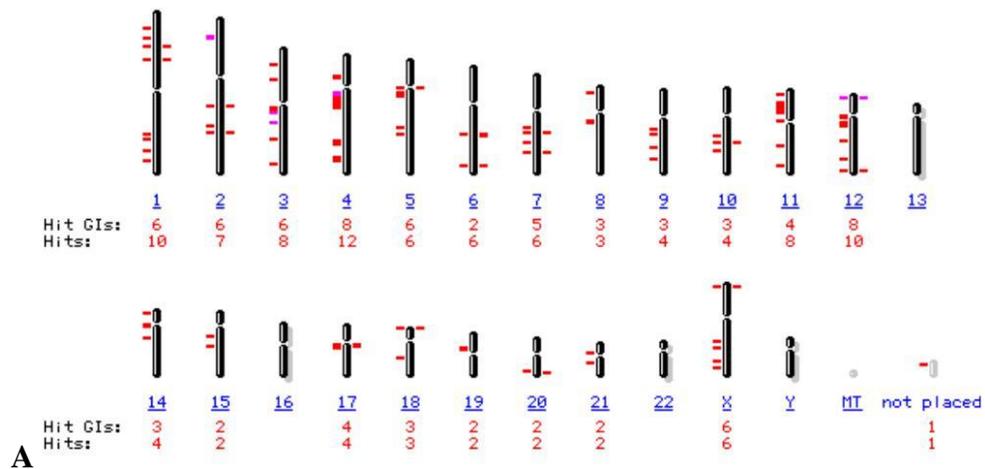


Figure 1.2. A : Localisation dans le génome humain des gènes de l'enveloppe de la famille HERV-W. Une séquence de l'enveloppe prototype (N° d'accès GenBank : AF331500) a été utilisée pour rechercher des séquences présentant une identité supérieure à 80% ; chaque point rouge indique leur localisation sur le chromosome correspondant. Image réalisée avec l'outil BLAST du NCBI. B : Détail des séquences possédant une forte identité avec l'enveloppe du HERV-W sur une région du chromosome X. D'après Perron et al. 1999 [10]

1.1.2. HERVs et leur implication dans certaines pathologies.

Même si la plupart des éléments appartenant à des rétrovirus endogènes sont défectifs, de nombreuses études suggèrent qu'ils pourraient jouer un rôle dans des pathologies comme la polyarthrite rhumatoïde ou certaines formes de cancers.

Dans ce manuscrit, nous allons principalement nous intéresser à la famille HERV-W qui a été, elle, impliquée dans sclérose en plaque (SEP) et dans certaines formes de schizophrénie [11]. En effet, la présence d'éléments appartenant à la famille HERV-W a été mise en évidence de manière répétée chez les patients atteints de SEP [12-14] et plus récemment chez des patients atteints de schizophrénie [15]. On retrouve ainsi des particules rétrovirales possédant une activité reverse-transcriptase chez les patients atteints de SEP. Il existe également des preuves de l'expression des protéines *env*, et *gag* au niveau des lésions et des zones démyélinisées du système nerveux central (SNC) des patients [16, 17].

Les phénomènes physiopathologiques conduisant à l'activation des séquences HERV endogènes et le rôle qu'elles jouent ensuite dans le développement des pathologies restent mal connus. Cependant le modèle proposé suggère que les séquences endogènes pourraient être activées par différents facteurs environnementaux (Figure 1.3). En particulier, dans le cas de la SEP, un rétrovirus appartenant à la famille HERV-W pourrait établir le lien entre l'inflammation du SNC chez les patients et les infections par d'autres virus comme les Herpesviridae qui sont souvent corrélées à l'apparition de la SEP (les caractéristiques de ce rétrovirus appelé MSRv seront présentées plus en détail dans la section suivante). Ainsi, H.Perron propose un modèle selon lequel les virus comme HHV6 ou HSV-1 seraient capable de réactiver les séquences endogènes HERV-W menant ensuite à la production aberrante d'une protéine d'enveloppe possédant des propriétés fortement pro-inflammatoires (Cf. 1.2.1).

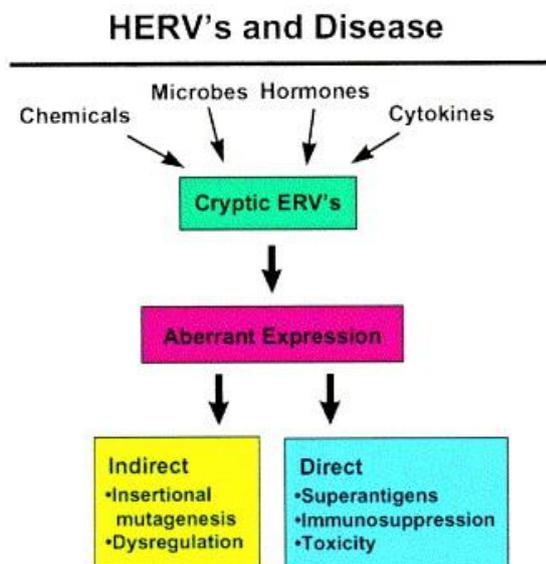


Figure 1.3. Mécanismes théoriques par lesquels les rétrovirus endogènes pourraient jouer un rôle dans certaines pathologies. Les séquences endogènes des HERVs peuvent être exprimées sous l'action de facteurs environnementaux. Dans certains cas ces expressions aberrantes peuvent avoir des conséquences pathologiques.

D'après Yolken et al. 2000 [18].

1.1.3. Le MSR/V : Multiple Sclerosis associated Retro Viral element

Le MSR/V a été découvert initialement en 1989 par H. Perron et son équipe qui ont mis en évidence la présence de particules rétrovirales possédant une activité reverse-transcriptase dans une lignée cellulaire leptoméningée (appelée LM7) isolée à partir du liquide céphalo-rachidien (ou fluide cérébro-spinal CSF) de patients atteints de SEP [12, 19, 20]. Sa présence a par la suite été mise en évidence dans les surnageant de culture de PBMCs (Peripheral Blood Monocytic cells) issus de ces patients [14, 20]. Les virions ont été isolés à partir de lymphocytes de patients SEP et il a été montré que l'injection de ces particules virales à des souris SCID humanisées provoquait la mort des animaux par hémorragie cérébrale en quelques jours [21].

De nombreuses études ont par la suite détecté des marqueurs rétroviraux associant la présence du MSR/V au développement de la SEP [13, 22-24]. Selon ces études il y a entre 50% et 100% des patients SEP pour lesquels on retrouve la présence du MSR/V et même si le rétrovirus ne semble pas détectable chez tous les patients, sa présence est généralement corrélée à un mauvais pronostic [23]. Certaines études suggèrent même que la présence MSR/V pourrait servir d'outil de diagnostic [23-25] ou d'indicateur de la réponse à certains traitements [26].

La découverte initiale de MSRNV a permis d'identifier le premier membre de la famille de rétrovirus endogènes humains HERV-W [3, 27, 28].

Bien que le MSRNV soit le membre fondateur d'une famille de rétrovirus endogènes, son origine reste controversée et il se pourrait qu'il soit d'origine exogène. Cependant, l'hypothèse qui reste privilégiée est celle d'un provirus endogène (de la famille HERV-W) dont les séquences seraient réactivées par des facteurs environnementaux en particulier des infections par d'autres virus puisque de tels mécanismes ont déjà été mis en évidence [29-33].

L'étude présentée dans ce manuscrit va se focaliser sur les propriétés de la protéine d'enveloppe du MSRNV.

Cette protéine d'enveloppe (Figure 1.4), composée de 542 acides aminés, est constituée d'un peptide signal d'adressage, d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intra-cytoplasmique. Elle possède également deux sites de clivage naturels en position 316 et 291, ce qui pourrait expliquer que l'on retrouve une forme soluble extracellulaire au niveau de la circulation sanguine. En effet, il a été récemment prouvé que cette protéine est retrouvée circulante dans le sérum des patients touchés par la SEP [16].

Une partie du domaine extracellulaire représentant ce que l'on appelle l'unité de surface (SU : Surface Unit) a été produite sous forme recombinante et plusieurs études ont pu montrer qu'elle possédait des caractéristiques immunogènes. Il a en particulier été démontré qu'elle possédait des propriétés pro-inflammatoires sur certaines cellules du système immunitaire comme les cellules dendritiques et les monocytes [34] (Cf 1.4.1.2.).

L'implication du MSRNV et en particulier de sa protéine d'enveloppe dans la pathogenèse de la SEP n'est pas encore totalement admise. Cependant plusieurs études se sont intéressées au lien de cette protéine avec la maladie. Il a ainsi été montré que les lymphocytes B et les monocytes issus de patients SEP exprimaient l'enveloppe du MSRNV [35]. De plus, des PBMC issus de patients SEP produisent plus de cytokines pro-inflammatoires en réponse à l'unité de surface ENV-SU par comparaison avec des PBMC issus d'individus sains. La quantité de cytokines produites est également corrélée avec la sévérité de la maladie chez les patients à partir desquels les PBMC ont été isolés [36, 37]. Ainsi, il apparaît de plus en plus probable que le MSRNV puisse jouer un rôle dans l'inflammation associée à la pathogenèse de la SEP [38].

EAVK----LQMEPKMQSKTKIYRRPLDRPASPRSDVNDIKGTPPEEISAAQPLLRPNSAG
 :::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
 EAVKLQIVLQMEPQMOSMTKIYRGPLDRPARLCSVDNDIEVTPPEEISTAQPLLHSNSVG

SS (PH74)= HERV.W7q (Syncytin 1) GenBank N°**AF072506**

::

SS (PV14) = MSRV GenBank N°**AF331500**

[: identité]

Domaine extracellulaire

K316 Site de clivage

[. Remplacements conservatifs]

Domaine transmembranaire

Domaine intra-cytoplasmique

[différences]

Unité immunosuppressive

Figure 1.4. Alignement des séquences de la syncytine 1 humaine et de la protéine d'enveloppe du MSRV. La séquence de la syncytine 1 est représentée en texte bleu, celle de l'enveloppe du MSRV en texte noir. Un lien représenté par deux points indique une identité entre les deux séquences. Un point indique un remplacement conservatif. Une absence de point indique une différence. Le domaine extracellulaire est encadré en vert, le domaine transmembranaire en rose et le domaine intra-cytoplasmique en noir. Le peptide immunosuppresseur est surligné en jaune. Enfin le site de clivage par la furine retrouvé en position 316 est encadré en orange.

1.1.4 Les propriétés de l'enveloppe du MSRV

Cette section a pour but de décrire les propriétés connues de l'enveloppe du MSRV qui soutiennent l'hypothèse qu'elle puisse jouer un rôle dans certaines pathologies comme la SEP du fait de son activité inflammatoire sur le système immunitaire.

1.1.4.1. L'enveloppe du MSRV exerce une activité de type superantigène

L'enveloppe du MSRV est capable d'exercer une activité de type superantigène sur les cellules immunitaires.

Les superantigènes sont caractérisés par leur capacité à activer et à faire proliférer de manière polyclonale une large proportion, de l'ordre de plusieurs pourcents, des lymphocytes T naïfs par comparaison à un antigène qui n'active qu'une très faible proportion, de l'ordre de fractions de millionième, de cellules T. Cette propriété particulière des superantigènes s'explique par la nature de leurs interactions d'une part avec les molécules du récepteur des cellules T (TCR) des lymphocytes T et d'autre part avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) présentatrices d'antigène (figure 1.5) :

- Les superantigènes se lient au TCR au niveau d'une région caractéristique des domaines variables de la chaîne β du TCR ($V\beta$) [39, 40]; en conséquence, tous les lymphocytes T exprimant le(s) $V\beta$ cibles sont activés, ceci quelque soit la nature de la chaîne α partenaire ainsi que de la diversité des jonctions créées par le réarrangement V-J ; la reconnaissance des antigènes dépend en général de la combinaison des $V\alpha$ - $V\beta$ ainsi que des régions de jonction V-J ;

- Les superantigènes se fixent aux molécules présentatrices sur une région exposée vers l'extérieur de la chaîne α ou β des molécules de CMH-II [41, 42]; ces régions d'interaction avec les superantigènes sont conservées dans toutes les molécules de CMH-II humaines ainsi que chez d'autres espèces ; ainsi tous les allèles des molécules de CMH-II peuvent présenter les superantigènes, à quelques exceptions particulières près ; les antigènes sont présentés sous forme de peptides enchâssés dans une poche créée par l'association des chaînes α et β des molécules de CMH-II caractéristiques des allèles, la présentation des antigènes est ainsi dite restreinte par le CMH.

Ainsi, les superantigènes ne nécessitent pas d'être présentés par une molécule du CMH-II, ne nécessitent donc pas d'apprêtement (processus de dégradation de l'antigène permettant au final la présentation d'un petit peptide antigénique complexé à une molécule du CMH-II) et ne nécessitent pas non plus d'être reconnus par la poche formée par la région complémentaire du TCR des cellules T, habituellement impliquée dans la reconnaissance du complexe CMH-peptide antigénique. Ils sont ainsi capables d'activer tous les clones de lymphocytes T naïfs possédant l'allèle du $V\beta$ liant le super-antigène. La prolifération massive des lymphocytes T

concernés est accompagnée d'une production de cytokines puis d'une délétion par apoptose de tous les clones T ayant proliféré [43]. Ainsi si l'on observe le profil de la réponse à un superantigène en mesurant le nombre de cellules T possédant la région V β correspondante, on remarque d'abord une augmentation de la fréquence des clones T possédant ce V β puis une forte diminution de la fréquence de ces clones après quelques jours.

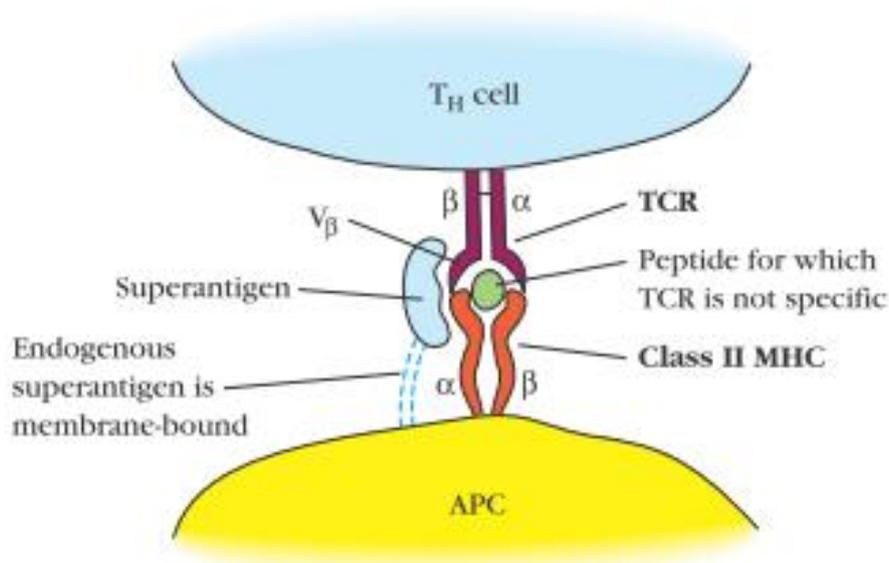


Figure 1.5. Représentation schématique de la liaison d'un super-antigène exogène ou endogène (lié à la membrane) entre la chaîne β du TCR exprimé par une cellule T et la chaîne α d'une molécule du CMH de classe II exprimée par une cellule présentatrice d'antigène (CPA) présentant un peptide non complémentaire du TCR. D'après Kuby Immunology, Goldsby et al. 2002[44]

Les superantigènes peuvent être d'origine exogène comme certaines toxines bactériennes ou bien endogènes, produits par des rétrovirus. Dans ce dernier cas, il est particulièrement intéressant de noter qu'un rétrovirus endogène capable de produire un superantigène a été largement étudié chez la souris. Il s'agit d'une protéine issue du MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) [45], un virus capable d'infecter les cellules B chez la souris et qui peut se transmettre par le lait [46]. La région 3'LTR du MMTV intégrée de façon stable au génome de certaines lignées de souris encode un superantigène [47] qui une fois exprimé par les

cellules B, induit une activation des cellules T qui en retour produisent des cytokines favorisant la prolifération de cellules B infectées [48]. La production du super-antigène est ainsi un élément important du cycle de vie du MMTV [49].

Dans le cas de l'enveloppe du MSR_V, il a été démontré qu'elle possédait elle aussi une activité de type superantigène [50]. Le traitement de PBL sains par l'enveloppe recombinante du MSR_V induit une expansion de la population des cellules T possédant la région V β 16 mais pas des cellules T exprimant d'autres V β . De plus, une analyse de la cinétique de la population de cellules T V β 16 suite au traitement par l'enveloppe recombinante a montré un profil typique d'une activité superantigène puisqu'il a d'abord été observé une forte expansion de cette population puis une déplétion au bout de 72 heures post traitement. Une analyse du répertoire de ces cellules T V β 16 par PCR de la région correspondant la jonction V β -J β a permis de démontrer que l'expansion de cette population était bien polyclonale et par cela caractéristique d'une réactivité à un superantigène. Cette propriété de forte activation de cellules T pourrait jouer un rôle dans la dérégulation du système immunitaire chez les patients atteints de SEP voire d'autres pathologies auto-immunes (Cf 1.2.1).

1.4.1.2. L'enveloppe du MSR_V exerce des propriétés pro-inflammatoires sur certaines cellules immunitaires.

En plus de ses propriétés de type superantigène, il a été démontré que l'enveloppe du MSR_V possédait également certaines propriétés pro-inflammatoires en agissant sur un récepteur de l'immunité innée[34]. Des monocytes humains exposés à de l'enveloppe recombinante de MSR_V, ou à des particules de MSR_V, produisent, de manière dose dépendante, plusieurs cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6, IL1 β et IL12p40). D'autre part, l'enveloppe est capable de stimuler la maturation de cellules dendritiques dérivées de monocytes et d'orienter ensuite la réponse de lymphocytes T vers un profil Th1 par la production d'IL12 pouvant supporter une réponse inflammatoire (Cf 1.4.2).

Le récepteur impliqué dans la reconnaissance de l'enveloppe été identifié comme le récepteur de l'immunité innée TLR4 et de son corécepteur CD14. Cette démonstration a été faite grâce à l'utilisation d'anticorps neutralisants dirigés contre ce couple de récepteurs. Ces anticorps ont en effet permis d'abolir la réponse pro-inflammatoire observée suite au

traitement des monocytes par la protéine d'enveloppe recombinante. De plus, d'autres travaux effectués chez la souris ont confirmé l'implication de TLR4/CD14 dans la reconnaissance de l'enveloppe par l'utilisation de souris TLR4 KO et CD14 KO [51].

Cette démonstration des propriétés pro-inflammatoires de cette enveloppe rétrovirale apporte des arguments supplémentaires pour appuyer l'hypothèse de son implication dans les processus pathogènes observés chez les patients.

1.2. La sclérose en plaques

La SEP est considérée comme une maladie inflammatoire chronique et neuro-dégénérative touchant le système nerveux central (SNC) [52]. D'origine auto-immune, on connaît cependant mal les facteurs aboutissant à cette dérégulation du système immunitaire. En effet, on observe chez les patients une inflammation et une infiltration massive de leucocytes et de macrophages auto-réactifs au niveau péri-vasculaires dans le SNC. Ces cellules immunitaires, principalement des lymphocytes T et des macrophages, sont responsables de la destruction des oligodendrocytes qui sont un type de cellules gliales ayant pour rôle la production des gaines de myéline. Ces dernières permettent une transmission plus rapide des signaux nerveux le long des axones par comparaison avec des axones non-myélinisés. La perte des oligodendrocytes entraîne donc une démyélinisation des axones avec pour conséquences des perturbations dans la transmission des influx nerveux, d'où l'apparition de troubles neuro-dégénératifs. Les lésions prennent la forme de plaques correspondant à des zones démyélinisées (d'où le nom de la maladie) et sont distribuées principalement au niveau de la substance blanche du SNC (là où se trouvent normalement les axones myélinisés), de la moelle épinière ainsi que du nerf optique. Selon la localisation et l'étendue des lésions dans le SNC, les symptômes prendront la forme de troubles variés de type cognitifs, sensoriels ou moteurs plus ou moins invalidants. Une échelle nommée EDSS (Expanded Disability Status Scale) permet d'évaluer le degré d'invalidité des patients et d'adapter les traitements en conséquence.

L'évolution de la maladie est généralement « en dents de scie » puisqu'elle se caractérise par des phases aiguës lorsque des plaques de démyélinisation se forment, suivies par des phases de rémission lorsque les plaques se résorbent. Quatre tableaux cliniques différents permettent de classer les formes de SEP et ainsi d'adapter les traitements. La forme RR-MS

(Relapsing Remitting Multiple Sclerosis) touche la plupart des patients et se caractérise par l'apparition soudaine de symptômes suivie par une rémission complète ou partielle de façon récurrente. Elle peut ensuite évoluer vers la forme SP-MS (Secondary Progressive MS) qui est une forme progressive au cours de laquelle on observe une augmentation de l'invalidité des patients. Lorsque la forme progressive apparaît dès le début de la maladie, elle est appelée PP-MS (Primary Progressive MS). Enfin, on distingue une dernière forme appelée RP-MS (Relapsing Progressive MS) qui est une combinaison de la forme récurrente et de la forme progressive.

La SEP est une maladie apparaissant généralement chez des individus assez jeunes (entre 20 et 40 ans) et touchant en majorité les femmes (environ trois femmes pour un homme). La prévalence varie de façon significative en fonction de la zone géographique, allant de moins de 20 cas pour 100 000 individus, jusqu'à 100 cas pour 100 000 individus. On retrouve ainsi une distribution géographique selon un gradient nord-sud puisque les zones les plus touchées sont les régions industrialisées en Europe, au Canada ou aux Etats-Unis.

1.2.1. Etiologie

De nombreux facteurs ont été impliqués dans la pathogenèse de la SEP. Du fait des disparités géographiques dans la prévalence de la maladie, des facteurs environnementaux sont certainement en cause. Les plus souvent évoqués sont les infections virales ou bactériennes ainsi que la durée d'exposition au soleil. Dans ce dernier cas, l'hypothèse voudrait que dans les régions plus septentrionales, la durée d'ensoleillement étant moindre, l'organisme produirait moins de vitamine D, ce qui aurait un effet négatif sur le système immunitaire et favoriserait ainsi l'apparition de désordres immunitaires (voir [53] pour une des nombreuses revues au sujet de l'hypothèse de la vitamine D). Une autre supposition qui permettrait d'expliquer la plus forte prévalence de la SEP dans les régions les plus industrialisées des pays du Nord s'appuie sur l'hypothèse de l'hygiène faisant référence au concept récent de médecine Darwinienne. Ce dernier met en relation l'augmentation de l'incidence des maladies inflammatoires et auto-immunes chroniques dans les pays développés avec l'accroissement sensible du niveau d'hygiène dans ces pays. En effet cet accroissement a pour effet d'isoler de plus en plus les individus des micro-organismes pathogènes ou non auxquels le système immunitaire était habitué à répondre efficacement et

qui permettaient la mise en place de réseaux de régulation. La perturbation voir la disparition de ces réseaux du fait de l'absence de certaines infections survenant habituellement pendant l'enfance, pourrait ainsi aboutir à des désordres immunitaires favorisant l'apparition de pathologies auto-immunes chez l'adulte ou le jeune adulte comme c'est le cas pour la SEP. De plus, l'un des éléments les plus souvent corrélés au développement de la SEP reste l'infection par divers virus que l'on retrouve chez les patients. Les études font souvent référence à l'EBV (Virus d'Epstein Barr) [54] ou à d'autres *herpes viridae* et ces infections pourraient être à l'origine de phénomènes inflammatoires menant à une réaction auto-immune chez des individus prédisposés (voir la revue de Krone et Grange [55]).

En effet, plusieurs études ont pu montrer qu'il existait des facteurs génétiques de prédisposition au développement de la pathologie puisqu'on observe par exemple une corrélation entre le pourcentage d'identité génétique et le risque de développement de la SEP chez des individus jumeaux. Ainsi, de nombreux gènes ont été impliqués en tant que facteurs de prédisposition et les plus couramment cités sont HLA DRB1 codant un allèle d'un gène du CMH de classe 2 ainsi que des gènes codant pour certains récepteurs des interleukines comme les gènes IL2RA ou IL7R [56, 57] (voir [58] pour une revue récente des différentes prédispositions génétiques).

Cependant, l'hypothèse qui prévaut à l'étude décrite dans ce manuscrit et qui la justifie, concerne les rétrovirus endogènes humains. En effet, depuis la découverte du MSR/V, les éléments permettant de penser que ce virus joue effectivement un rôle dans l'étiologie de la SEP se sont accumulés. Le modèle proposé récemment par H. Perron permet aujourd'hui de faire un lien entre les différentes infections virales initiales retrouvées chez les patients et la pathologie inflammatoire auto-immune qui apparaît plus tardivement [10, 16] (Figure 1.6).

Ce modèle propose une première phase d'infection par des virus exogènes capables de trans-activer des séquences appartenant à un rétrovirus endogène [29, 31, 32, 59] appartenant à la famille HERV-W (probablement le MSR/V). Ce phénomène de trans-activation des séquences endogènes HERV-W par l'EBV a d'ailleurs été démontré très récemment au niveau des cellules sanguines et des astrocytes [60]. Cela peut mener à la production de particules virales ou à la sécrétion de la protéine d'enveloppe. Cette dernière va ensuite agir de deux manières différentes. D'une part, elle est capable d'initier une réaction inflammatoire via le récepteur TLR4 en activant différents types cellulaires comme les astrocytes ou les macrophages qui vont pouvoir endommager directement les oligodendrocytes. Il a également été démontré que la protéine d'enveloppe était exprimée dans les lésions [17] et que son

expression par les oligodendrocytes induisait la production d'espèces réactives cytotoxiques pour ces cellules[61]. Il y a donc un effet directement délétère de l'enveloppe sur les cellules productrices de myéline. D'autre part, l'activité superantigénique de l'enveloppe [50] permet d'établir un lien entre sa présence chez les patients et la dérégulation du système immunitaire adaptatif (les lymphocytes T prennent aussi part aux dommages causés à la myéline). En effet, plusieurs mécanismes pourraient initier puis amplifier la réaction inflammatoire suite à la reconnaissance du super-antigène par les lymphocytes T. L'activation de ces lymphocytes T peut amener à la production de cytokines pro-inflammatoires qui vont déclencher une inflammation localement mais également conduire, via cette production de cytokines, à l'activation d'autres cellules immunitaires et ainsi amplifier la réaction. L'expansion polyclonale de ces lymphocytes T peut également conduire à une augmentation du nombre de lymphocytes potentiellement auto-réactifs et capables de reconnaître des antigènes myéliniques, aboutissant ainsi à la pathologie auto-immune.

Les autres éléments connus entrant en jeu dans la pathogenèse de la SEP comme les facteurs environnementaux ou génétiques ne sont bien sûr pas exclus par le modèle mettant en avant le rôle des rétrovirus endogènes humains et peuvent s'y greffer sans en modifier la pertinence.

On notera cependant pour finir qu'une autre hypothèse connue sous le nom d'« antigène mimicry » tente également d'expliquer le lien fort qui existe entre l'infection par l'EBV et le développement de la SEP. Cette hypothèse repose sur l'existence d'une réactivité croisée entre des antigènes provenant de l'EBV et des peptides dérivés de la myéline. En effet, une petite proportion (environ 4%) des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques de l'EBNA-1 (Epstein-Barr Nuclear Antigen - 1) sont également capables de reconnaître des peptides provenant de la myéline [62]. Ce phénomène pourrait expliquer l'initiation d'une réaction auto-immune contre la myéline. Cependant, cette hypothèse reste discutée du fait que l'EBV ne soit pas le seul virus corrélé à l'apparition de la SEP et qu'elle n'explique pas la présence des cellules B auto-réactives dans le SNC des patients [63].

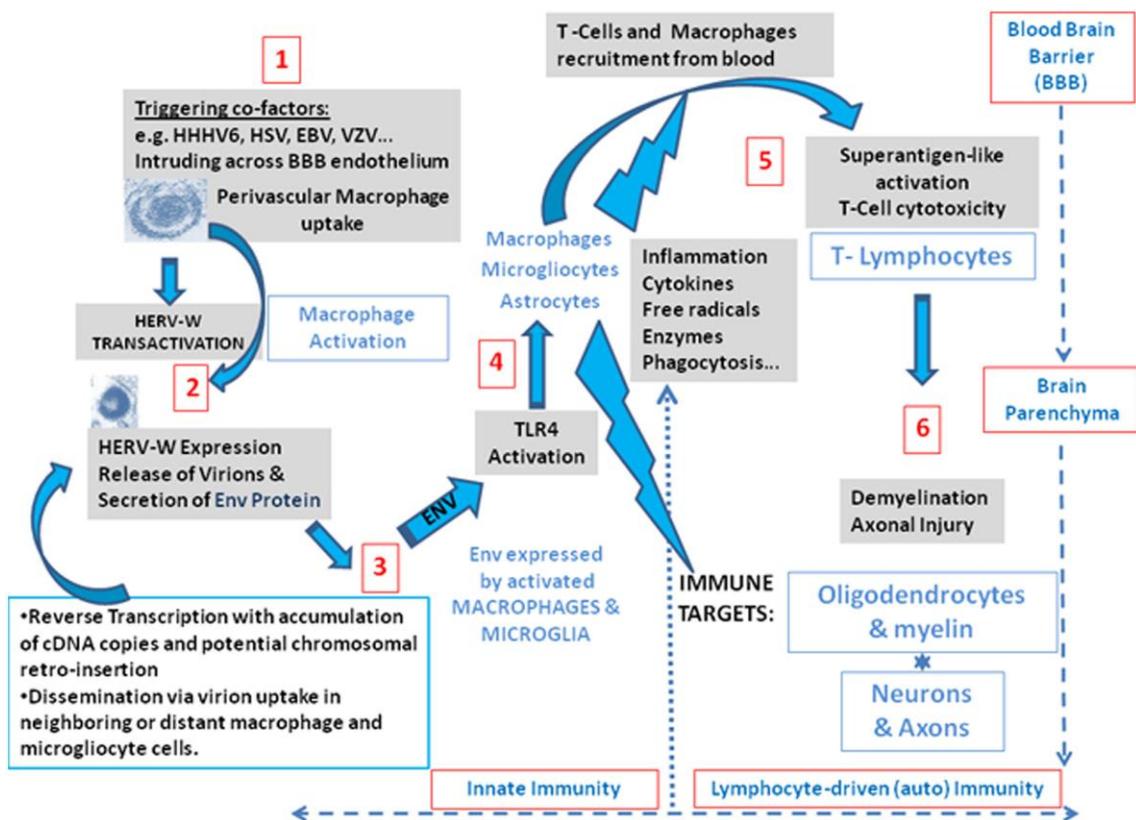


Figure 1.6. Modèle proposé par H. Perron et al. montrant le rôle central que pourrait jouer les rétrovirus de la famille *HERV-W* et en particulier la protéine d'enveloppe en faisant un lien entre les facteurs viraux initiaux et la pathologie auto-immune. (1) Des facteurs exogènes comme des infections par des Herpès virus trans-activent les séquences endogènes de *HERV-W* (2) menant à la production de virions et d'une protéine d'enveloppe (3) capable d'activer l'immunité innée via le récepteur TLR4(4). Cette activité pro-inflammatoire combinée à une activité de type superantigène (5) conduit à une dérégulation du système immunitaire favorisant ainsi l'apparition de la pathologie auto-immune (6). D'après Perron et al. *Journal of multiple sclerosis*, 2012 [16].

1.2.2. Physiopathologie

Les patients atteints de SEP présentent des lésions démyélinisantes dans lesquelles on observe un grand nombre de cellules immunitaires issues du sang. On retrouve également chez les patients un taux élevé d'anticorps anti-myéline. Il est donc admis que la SEP débute par l'apparition de lésions d'origine inflammatoires caractérisées par une perturbation et une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) vis-à-vis des cellules immunitaires [64] alors que la perméabilité de la BHE est très limitée en conditions normales (Cf. 1.3.2). Différents types cellulaires se retrouvent alors dans l'espace péri-vasculaire et vont pouvoir endommager les gaines de myéline. On retrouve en particulier des lymphocytes T CD4 à profil Th1, des lymphocytes T CD8 cytotoxiques, des lymphocytes B, des plasmocytes sécrétant d'anticorps dirigés contre la myéline ainsi que des macrophages. Il peut y avoir plusieurs périodes de rupture de la BHE sans pour autant que l'on puisse observer de symptômes neuro-dégénératifs. Ces ruptures sont visibles par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) et seraient 10 fois plus fréquentes que les épisodes symptomatiques [65]. Pendant les phases récurrentes, les zones d'inflammations ont tendance à se résorber et la myéline à se reformer mais le cerveau possède une capacité limitée à réparer ces lésions. Lorsque la maladie devient progressive, les dommages causés à la myéline ne sont plus totalement réparés, les lésions deviennent alors irréversibles et on observe une perte graduelle de certaines fonctions cognitives.

1.2.3. Traitements

Jusqu'à maintenant les traitements disponibles pour la SEP permettent seulement de diminuer les symptômes durant les phases aiguës ou chroniques mais il n'existe pas de remède curatif.

Les phases aiguës se traitent généralement par des anti-inflammatoires puissants comme les corticostéroïdes. Il existe différents traitements immunosuppresseurs permettant de maîtriser l'inflammation durant les phases chroniques et ainsi limiter la survenue des phases aiguës. L'utilisation de l'interféron β permet par exemple d'empêcher l'activation, la différenciation et la prolifération des lymphocytes T et également les phénomènes de migration trans-endothéliale à travers la BHE mais ce traitement peut avoir des effets

secondaires indésirables. Il existe aussi des traitements utilisant des anticorps monoclonaux comme le Natalizumab qui cible et inhibe l'interaction entre VLA-4, une intégrine exprimée par les leucocytes activés et VCAM-1, une molécule d'adhésion exprimée par les cellules endothéliales, empêchant ainsi l'étape d'adhésion qui précède la migration trans-endothéliale. Enfin, l'acétate de glatiramère est un composé synthétique ayant également une efficacité prouvée mais dont le mode d'action n'est pas complètement compris. Il agirait comme un antagoniste de l'interaction entre la myéline et le récepteur des cellules T (TCR) auto-réactives qui reconnaissent spécifiquement un antigène myélinique. (Voir la revue de Mendes et al. [66] pour une description détaillée des thérapies existantes)

Il est à noter qu'une approche innovante ciblant les rétrovirus endogènes et plus particulièrement le MSR/V est en cours de développement et en phase d'essais cliniques. Ce traitement permettrait d'inhiber l'interaction du MSR/V ou de sa protéine d'enveloppe avec les cellules saines en utilisant des anticorps monoclonaux neutralisants, s'attachant ainsi à traiter l'une des causes probables de la maladie plutôt que ses symptômes. La présence de rétrovirus HERV-W chez les patients pourrait de plus avoir une valeur prédictive de leur réponse aux traitements [26, 67].

1.3. L'endothélium vasculaire

L'un des rôles de l'endothélium vasculaire est d'isoler la circulation sanguine de l'espace péri-vasculaire tout en possédant une certaine perméabilité vis-à-vis des composants (moléculaires ou cellulaires) du sang. Cette perméabilité est plus ou moins importante selon le type d'endothélium et elle est de plus régulée d'un point de vue immunologique pour permettre par exemple la migration de cellules immunitaires vers le lieu d'une infection ou d'une lésion, à partir du sang. Il existe plusieurs types d'endothélium et l'étude présentée dans ce manuscrit s'est principalement intéressée à l'endothélium vasculaire cérébral, du fait de son implication dans la pathogénèse de la SEP.

1.3.1. Généralités

L'unité de base de tout type d'endothélium est la cellule endothéliale. Ces cellules recouvrent de manière jointive l'intérieur des capillaires sanguins. Elles sont également polarisées puisqu'elles possèdent un pôle apical en contact avec le flux sanguin et un pôle basolatéral en contact avec une membrane basale. Cette dernière est constituée de molécules comme le collagène ou la fibronectine et permet l'ancrage des cellules endothéliales ainsi que le maintien de la structure des capillaires.

Une des caractéristiques principales des cellules endothéliales est de pouvoir former entre elles des jonctions grâce à l'expression de diverses protéines. Une régulation des niveaux d'expression ou de l'activité de ces protéines permet ensuite des modifications de la perméabilité vasculaire vis à vis des cellules circulant dans le flux sanguin mais également vis-à-vis des petites molécules. Il existe deux types de jonctions intervenant dans les contacts entre cellules qui permettent de définir une polarité apico-basale :

- Les jonctions adhérentes : situées en position basale, elles permettent d'établir un lien entre des cellules adjacentes en reliant les cytosquelettes d'actine via des protéines transmembranaires et permettent également l'ancrage des cellules à la matrice extracellulaire. Elles sont présentes sur les cellules épithéliales et endothéliales. L'organisation des jonctions adhérentes des cellules endothéliales se fait autour d'une protéine transmembranaire, la VE-cadhérine (Vascular Endothelial Cadherin). Les VE-cadhérines exprimées par des cellules jointives interagissent de manière homotypique via leur domaine extracellulaire tandis que les domaines intra-cytoplasmiques sont reliés indirectement au cytosquelette d'actine via les caténines α et β ou la vinculine. Précisons également qu'une autre protéine nommée PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1) participe à la formation des jonctions adhérentes de manière similaire à la VE-cadhérine mais en interagissant seulement avec la β caténine [68].

- Les jonctions serrées : Situées plutôt en position apicale, ce sont elles qui assurent l'imperméabilité de l'endothélium vis à vis du fluide circulant dans le lumen du vaisseau sanguin ou du capillaire. Comme les jonctions adhérentes, elles sont maintenues par plusieurs types de protéines transmembranaires interagissant de manière homotypiques par leurs domaines extracellulaires et liées au cytosquelette d'actine par leur domaine intra-cytoplasmique. On distingue 4 grands types de protéines impliquées dans la formation des

jonctions serrées. Les claudines et les occludines sont des protéines transmembranaires reliées au cytosquelette via des protéines adaptatrices de premier ordre ZO 1, 2 et 3 (Zonula Occludens) et des protéines adaptatrices de second ordre telles que la cinguline ou l'afadine. Les JAMs (Junctional Adhesion Molecules) et ESAMs (Endothelial Selective Adhesion Molecule) sont, elles, des protéines appartenant à la superfamille des immunoglobulines et sont impliquées dans les phénomènes de migration leucocytaire en plus de leur rôle dans le maintien de la structure des jonctions serrées. De nombreuses protéines régulatrices peuvent ensuite interagir avec les protéines adaptatrices et ainsi permettre un remodelage rapide des jonctions au cours de certains phénomènes physiologiques ou pathologiques.

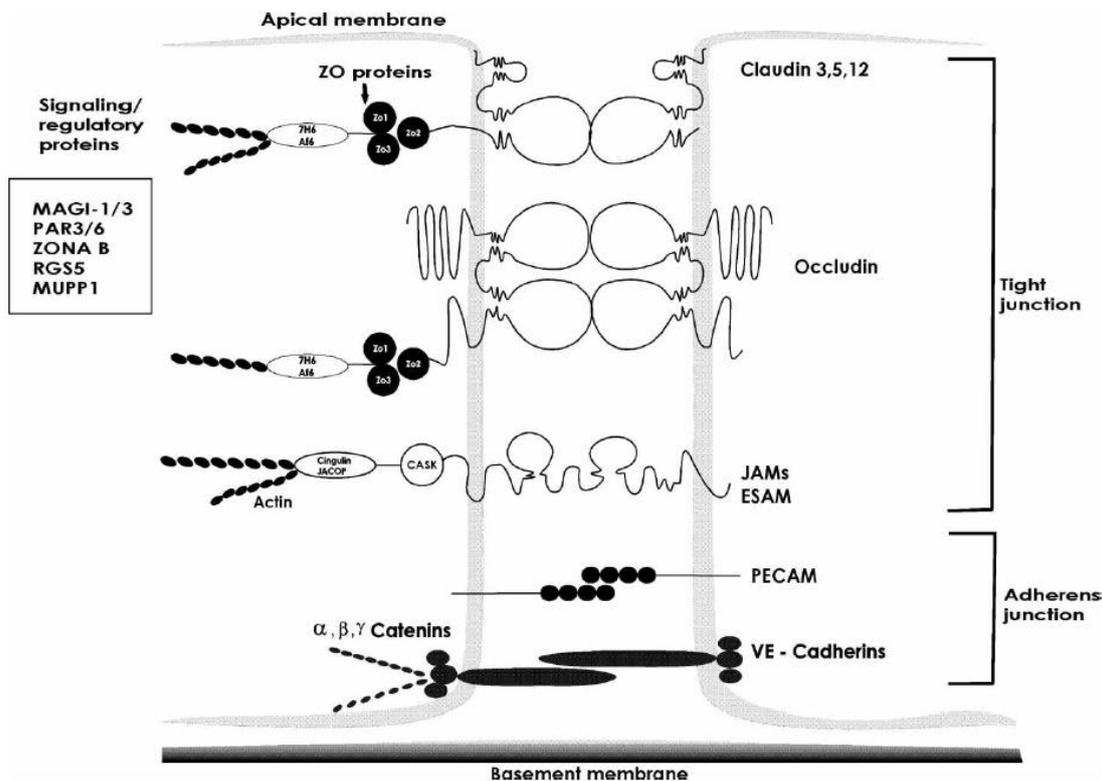


Figure 1.7. Représentation schématique des différentes protéines impliquées dans formation des jonctions adhérentes et jonctions serrées et de leurs protéines adaptatrices faisant le lien avec le cytosquelette. D'après Correale & Villa, *Autoimmunity*, 2007 [69].

Le contrôle de la perméabilité des jonctions serrées et adhérentes est important pour permettre une régulation de la composition du milieu péri-vasculaire en molécules solubles, ions, nutriments, mais également pour permettre certains phénomènes de migration cellulaire en particulier celle de cellules immunitaires dans un contexte inflammatoire (cf. 1.5.2). Dans le cas de la SEP, on observe par exemple une diminution de l'expression des protéines ZO-1 et de l'occludine ce qui corrèle avec l'infiltration anormale de cellules immunitaires dans l'espace péri vasculaire au niveau des plaques de démyélinisation [70, 71].

1.3.2. Le cas particulier de la barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique est une structure que l'on retrouve uniquement au niveau des capillaires et micro-capillaires sanguins irriguant le système nerveux central. L'endothélium y adopte en effet une structure particulièrement étanche grâce à l'établissement des jonctions serrées mais également grâce à la participation d'un autre type cellulaire, les astrocytes. La barrière hémato-encéphalique permet ainsi d'isoler le SNC de la circulation sanguine et des éventuels pathogènes qui s'y trouveraient. Elle permet également de préserver le privilège immunitaire du cerveau en ne permettant pas la migration des leucocytes dans l'espace péri-vasculaire (ou alors de manière finement régulée). En effet, on retrouve, en situation normale, très peu de cellules immunitaires au niveau extra vasculaire dans cet organe [72].

L'étanchéité de la BHE est due principalement aux cellules endothéliales formant entre elles des jonctions serrées et adhérentes plus restrictives que dans les autres organes puisqu'elles ne permettent pas la diffusion passive des petites molécules solubles. Les jonctions serrées de la BHE jouent un rôle important dans la régulation des phénomènes inflammatoires se produisant dans le cerveau [73]. Les cellules endothéliales sont entourées par une membrane basale formant une épaisse matrice extracellulaire composée de collagène, fibronectine et protéoglycanes. Autour de cette membrane basale, on retrouve de nombreux prolongements d'origine astrocytaires (appelés pieds astrocytaires) qui viennent en sus pour stabiliser la structure de la BHE. On estime qu'environ 90% de la surface des microcapillaires sanguins cérébraux est recouverte par les pieds astrocytaires. Les astrocytes sont des cellules gliales jouant différents rôles au sein du SNC en plus de leur participation au maintien de la BHE, comme la régulation de l'activité des neurones, le recyclage des neurotransmetteurs ou

des phénomènes de réparation. Le rôle important des astrocytes dans la formation et le maintien de la BHE est connu depuis qu'il a été démontré qu'ils étaient capables de conférer des propriétés de type BHE à des endothéliums d'origine non-neurale [74] et que leur ablation sélective dans des souris transgéniques provoquerait une rupture de la BHE [75]. Enfin, il faut noter que l'endothélium cérébral est également recouvert en partie par des péricytes. Ces cellules ont essentiellement une fonction contractile donc un rôle dans le contrôle du débit sanguin. Mais les péricytes cérébraux sont aussi capables d'endocytose et endosseraient donc une fonction secondaire de macrophages au sein du SNC. Il a par ailleurs été montré récemment que les péricytes sont nécessaires au maintien de la restrictivité de la BHE et à la formation des jonctions serrées des cellules endothéliales [76, 77].

Une des caractéristiques mesurables des barrières endothéliales est la résistance électrique trans-endothéliale (TEER : Trans Endothelial Electrical Resistance). La TEER permet d'avoir une représentation de l'imperméabilité des jonctions serrées d'une barrière endothéliale ou épithéliale. Elle peut être mesurée par une différence de potentiel entre 2 électrodes, en Ω/cm^2 et plus les jonctions sont serrées plus la valeur mesurée est élevée. Une particularité supplémentaire de la BHE est d'avoir une valeur de TEER plus élevée que les endothéliums retrouvés dans d'autres organes [78].

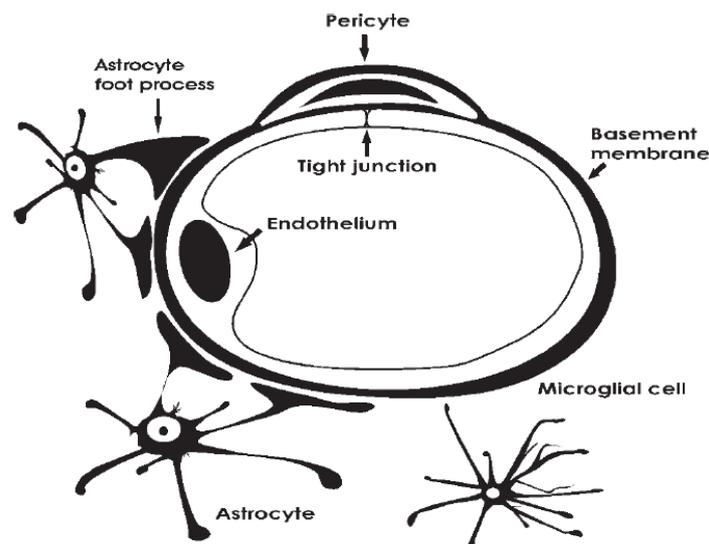


Figure 1.8. Représentation schématique des différents constituants de l'endothélium vasculaire cérébral. D'après Correale & Villa, Autoimmunity, 2007 [69].

1.3.3. Les modèles *in vitro* d'endothélium

Cette section a pour but de décrire principalement les deux modèles *in vitro* d'endothélium vasculaire utilisés dans l'étude présentée dans ce manuscrit. De nombreux modèles d'endothéliums ont été décrits, certains utilisant des cultures primaires, d'autres des lignées cellulaires provenant de cellules immortalisées. Parmi eux, beaucoup sont issus de cellules murines ou de rat, plus faciles à obtenir que des cellules humaines (voir la revue de Wilhelm et al. 2011 [79] pour une description des modèles de BHE existants).

Dans cette étude, nous avons choisi d'utiliser uniquement des modèles cellulaires humains car les protéines étudiées ont été isolées dans des pathologies humaines, de même que les études menées jusqu'à présent concernant leurs effets pro-inflammatoires l'ont été sur des cellules immunitaires humaines. Le modèle cellulaire principalement utilisé ici est un modèle simplifié de barrière hémato-encéphalique utilisant une lignée cellulaire. Il a été initialement choisi du fait de l'implication de cette barrière à des stades précoces du développement de la SEP [80]. Par la suite, un modèle d'endothélium non-cérébral et utilisant des cultures primaires a également été utilisé afin de valider les résultats obtenus sur un autre type de cellules endothéliales.

1.3.3.1. Un modèle de barrière hémato-encéphalique : les cellules HCMEC/D3

Il est très difficile d'obtenir des cellules endothéliales provenant du cerveau humain c'est pourquoi la plupart des cultures primaires de cellules endothéliales cérébrales sont obtenues chez l'animal. Pour cette étude, il a donc été décidé d'utiliser une lignée cellulaire humaine provenant de micro-capillaires sanguins cérébraux. La seule lignée cellulaire humaine permettant de modéliser la barrière hémato-encéphalique et correctement caractérisée à ce jour est la lignée HCMEC/D3 (Human Cerebral Microvascular Endothelial Cells / D3). Cette lignée décrite depuis 2005 [81] a été obtenue après transfection d'une culture primaire avec une télomerase reverse transcriptase humaine (hTERT) et l'antigène T du virus SV40 (un proto-oncogène) en utilisant un système lentiviral, lui conférant ainsi une capacité de se diviser quasi indéfiniment.

Il a été montré que cette lignée continue d'exprimer des marqueurs et des propriétés caractéristiques de la BHE jusqu'à plus de 35 passages. En effet, les HCMEC/D3 expriment la plupart des protéines de jonctions et protéines adaptatrices impliquées dans la formation des jonctions serrées et adhérentes retrouvées au niveau de la BHE (Figure 1.9). De façon plus intéressante dans ce cadre de l'étude décrite ici, il a également été montré que les HCMEC expriment les molécules d'adhésion comme ICAM-1 ou VCAM-1 impliquées dans les phénomènes de migration trans-endothéliale et répondent à des stimuli pro-inflammatoires comme le TNF- α en les surexprimant [81]. Cela fait de ces molécules d'adhésion de bons témoins d'inflammation.

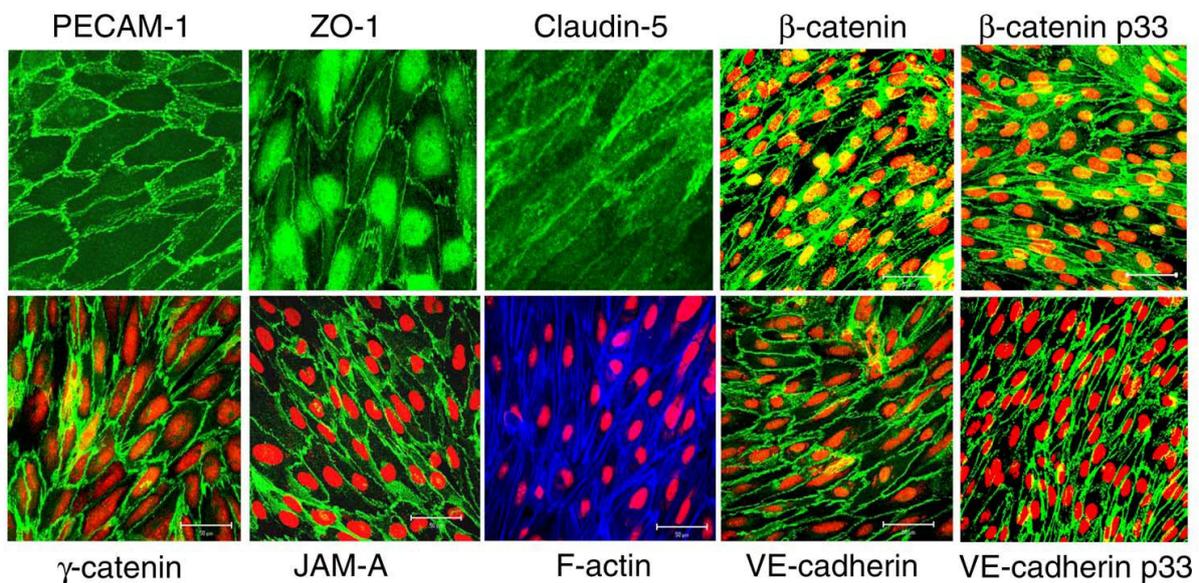


Figure 1.9. Images d'immunofluorescence montrant l'expression de différentes molécules impliquées dans la formation des jonctions serrées et adhérentes ainsi que certaines protéines adaptatrices. Les noyaux apparaissent en rouge. D'après Weksler et al. 2005 [81].

Une fois mises en culture, les HCMEC/D3 forment des monocouches de cellules adhérentes sur une matrice de collagène ou de fibronectine. Cependant il a été montré récemment que ce modèle de monocouche simple pouvait être amélioré en réalisant des cocultures de HCMEC/D3 avec différents autres types cellulaires impliqués dans la formation

de la BHE comme les astrocytes ou les péricytes en utilisant des systèmes de co-culture en chambre de Boyden. La mesure de la TEER (Cf. 1.3.2) a en effet permis de démontrer une meilleure imperméabilité des jonctions cellulaires lorsque les HCMEC/D3 sont cultivées en présence d'astrocytes humains [82].

1.3.3.2. Un modèle d'endothélium « classique » : Les HUVEC

Les HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) sont des cultures primaires de cellules endothéliales humaines isolées à partir de la veine du cordon ombilical. Elles représentent un modèle d'endothélium classique largement répandu car elles ne nécessitent pas de travailler à partir de résections ou de pièces opératoires. Elles sont utilisées depuis longtemps pour une modélisation classique de l'endothélium vasculaire.

Les HUVEC expriment aussi les molécules d'adhésion impliquées dans la diapédèse, de plus leur profil de réponse inflammatoire est connu [83] ce qui, dans le cadre de cette étude, en fait un bon modèle afin de comparer les résultats avec ceux obtenus sur les HCMEC/D3.

1.4. Le système immunitaire

Cette section du manuscrit n'a pas vocation à faire un descriptif complet de l'ensemble du système immunitaire mais simplement à introduire quelques notions essentielles à la compréhension de l'étude, en particulier concernant le système immunitaire inné et ses récepteurs au niveau de l'endothélium vasculaire, ainsi que les phénomènes d'inflammation et de diapédèse.

Le système immunitaire humain a pour rôle l'élimination des agents potentiellement pathogènes pour l'individu tels que les virus, les bactéries voir même certains éléments endogènes comme les cellules tumorales. Il est classiquement subdivisé en 2 grands ensembles, le système immunitaire inné non spécifique et le système immunitaire adaptatif spécifique d'un pathogène particulier.

1.4.1. Le système immunitaire inné

Il constitue la première ligne de défense de l'organisme et a pour rôle de détecter et de lutter contre d'éventuels pathogènes immédiatement après le franchissement d'une barrière anatomique et de manière non spécifique. L'immunité innée repose sur un réseau de cellules circulantes et périphériques capables de reconnaître des motifs associés à des pathogènes (appelés PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns) grâce à des récepteurs particuliers appelés PRR (Pattern Recognition Receptors). Il existe plusieurs types de PRR essentiellement exprimés par les cellules jouant un rôle dans l'immunité innée comme les cellules dendritiques ou les macrophages. Les PRR peuvent être membranaires ou cytoplasmiques. On citera en particulier les récepteurs aux lectines capables de reconnaître divers pathogènes comme les bactéries ou certains virus recouverts de lectines de type C, les NLR (NOD Like Receptors) qui sont des récepteurs cytoplasmiques capables de reconnaître des bactéries via leurs peptidoglycanes ou bien les TLR (Toll Like Receptors) qui seront décrits plus en détails dans la section 1.4.1.1.

L'engagement d'un PRR par son ligand va ensuite conduire à différents phénomènes inflammatoires suivant le type de cellule impliquée dans la reconnaissance du pathogène. On pourra ainsi observer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires permettant l'activation des cellules immunitaires, et la production de chimiokines permettant le recrutement de nouvelles cellules sur le site d'infection à partir du sang.

On notera enfin que le fonctionnement de l'immunité innée est également dépendant du système du complément. Ce système repose sur un ensemble de protéines sériques circulantes qui après une cascade d'activation suite à la rencontre avec un pathogène, conduit à diverses réactions comme l'opsonisation (facilitant la phagocytose) ou bien la lyse directe du pathogène grâce à la formation d'un complexe d'attaque membranaire.

1.4.1.1. Les récepteurs de type toll (TLRs)

Les TLR sont des récepteurs de type PRR initialement identifiés chez la drosophile [84]. Ils jouent un rôle central dans l'initiation de l'immunité innée contre certains pathogènes [85]. Il existe à ce jour 13 types de TLR identifiés chez l'homme, chacun étant capable de

reconnaitre un ou plusieurs PAMPs. Les TLR sont généralement exprimés sous forme d'homo-dimères transmembranaires et se trouvent souvent associés à la membrane plasmique mais peuvent aussi se trouver dans des compartiments intracellulaires comme c'est le cas pour les TLR 3, 7, 8 et 9. On notera que certains TLRs peuvent également former des hétéro-dimères comme l'association entre TLR2 et TLR1 ou 6. Le domaine externe qui interagit avec le ligand est composé de domaines LRR (Leucine Rich Regions) répétées. Le domaine intra-cytoplasmique qui est impliqué dans la transduction du signal est appelé domaine TIR (Toll/IL-1 R) car identique à celui du récepteur à l'IL-1 (IL-1 R). Il se compose de 3 régions homologues.

Principalement exprimés par des cellules immunitaires « sentinelles » comme les cellules dendritiques les monocytes ou les macrophages, on les retrouve également à la surface de cellules de l'immunité innée comme les lymphocytes B et T ou encore sur certaines cellules épithéliales ou endothéliales [86].

Les TLR sont capables de reconnaître une large gamme de PAMPs issus de virus [87], bactéries voir même de l'hôte comme certaines protéines de choc thermique (voir la revue de Akira et Takeda [88] pour un inventaire non exhaustif des motifs reconnus). L'engagement d'un TLR par son ligand entraîne un changement de conformation du récepteur et le recrutement de protéines adaptatrices qui vont initier une cascade de signalisation menant à l'activation transcriptionnelle de gènes cibles. Il existe deux grandes voies de signalisation en aval des TLR :

- La voie dépendante de Myd88 : C'est la voie classique qui peut être activée en aval de tous les TLR à l'exception de TLR3. Dans cette voie, Myd88 (Myeloid differentiation primary-response protein 88) est la première protéine adaptatrice recrutée au niveau du récepteur et elle initie une cascade aboutissant à la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B et à la transcription de gènes impliqués dans la régulation de la réponse inflammatoire comme la production de cytokines ou impliqués dans de la réponse immunitaire cellulaire comme la régulation de la maturation des cellules dendritiques.
- La voie indépendante de Myd88 : C'est une voie alternative qui peut être activée en aval de TLR3 et TLR4. Elle démarre par le recrutement des protéines adaptatrices TRAM-TRIF (TRIF related adaptor molecule - TIR domain containing adapter inducing interferon β) et aboutit également à la translocation de NF- κ B mais induit cette fois la transcription de

gènes impliqués dans la réponse à l'interféron de type 1, une réponse qui est donc plutôt antivirale.

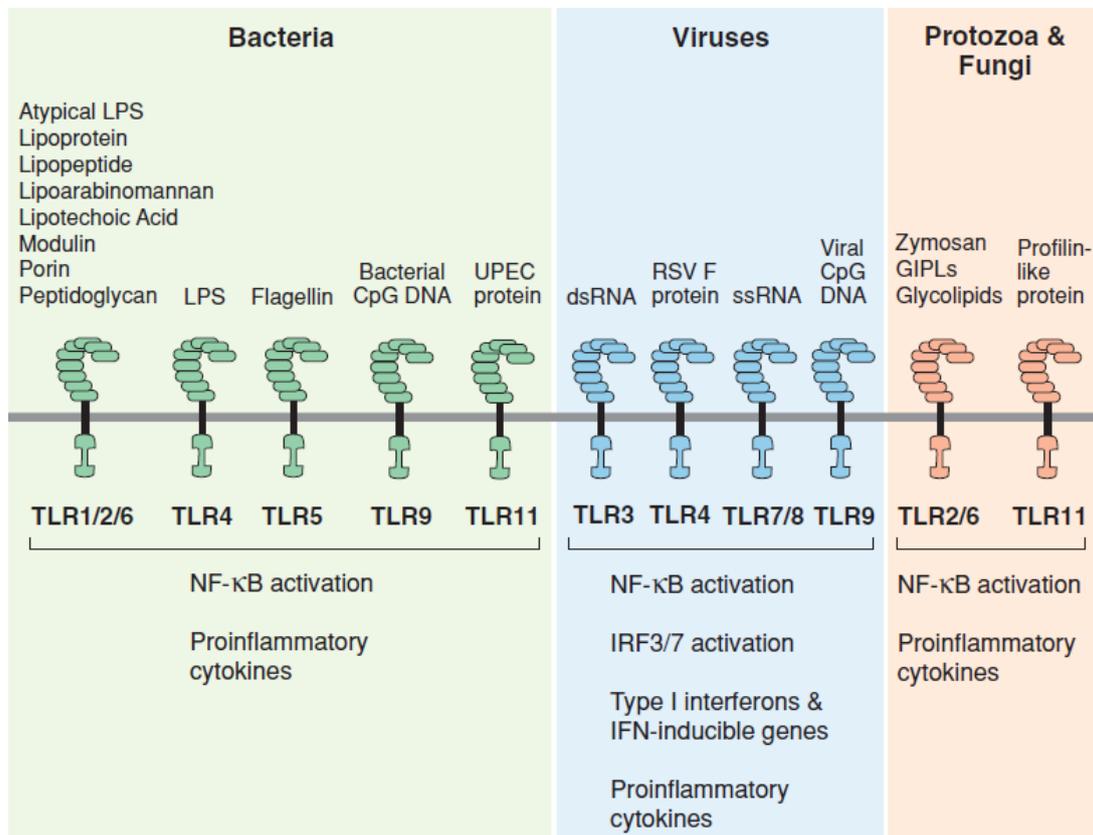


Figure 1.10. Schéma présentant les différents ligands des TLRs, leurs origines, les voies de signalisation en aval des récepteurs ainsi que les principaux types de réponses immunitaires activés dans chacun des cas D'après West et al. 2006 [89].

1.4.1.2. Le récepteur TLR4

TLR4 est certainement le récepteur TLR le mieux caractérisé à ce jour. Principalement impliqué dans la reconnaissance du LPS (Lipo Poly-Saccharide) présent à la surface des bactéries gram négatives, l'étude présentée ici s'est intéressée à lui pour sa capacité précédemment démontrée à reconnaître des protéines d'origine virale dont des protéines

d'enveloppe et en particulier celle du rétrovirus MSRV [34, 90, 91]. Même si le LPS est l'agoniste initialement décrit pour ce récepteur [92-94], TLR4 est aussi capable de reconnaître divers motifs bactériens ou d'origine virale comme présentés sur la figure 1.10. C'est également le seul TLR connu capable d'initier une signalisation à la fois par la voie Myd88 et par la voie TRAM-TRIF. Enfin, il est particulièrement intéressant de noter que TLR4 a précédemment été décrit comme étant capable de reconnaître chez la souris un autre rétrovirus endogène, le MMTV, et d'initier ainsi l'activation de cellules dendritiques [90] de la même façon que le MSRV. Ainsi, ce dernier n'est pas le seul rétrovirus connu capable d'initier une réponse immunitaire de type pro-inflammatoire par l'intermédiaire du récepteur TLR4.

Le fonctionnement de TLR4 est en partie dépendant d'autres composants solubles ou membranaires tels que MD-2 (Myeloid Differentiation factor 2), la LBP (LPS Binding Protein) [95] ou bien CD14 [96]. MD-2 est une molécule indispensable à l'expression de TLR4 à la membrane et à la reconnaissance du LPS. Elle est liée à TLR4 sur sa partie extracellulaire. La LBP est une protéine de type lipide-transférase circulante. Elle permet de faciliter le transfert du LPS vers CD14. Cette dernière est considérée comme un corécepteur de TLR4 que l'on retrouve sous forme circulante ou bien membranaire. CD14 n'est pas absolument nécessaire à reconnaissance du LPS par TLR4 mais intervient dans la réponse à des doses faibles de LPS alors que la réponse à de fortes doses est indépendante de ce corécepteur [97].

TLR4 est un récepteur qui subit une maturation entre sa synthèse dans le réticulum endoplasmique et son passage dans l'appareil de Golgi. Ainsi il peut être glycosylé avant de devenir fonctionnel et d'être exprimé à la membrane en association avec MD2 [98]. De plus, et contrairement au modèle le plus souvent admis d'un récepteur exprimé de façon stable à la surface de la cellule, il existe en réalité un trafic rapide de TLR4 entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique. Ce trafic à double sens fait que le récepteur n'est exprimé que de façon transitoire à la membrane tant qu'il n'a pas été engagé par son ligand [99].

Suite à la rencontre d'un ligand, la voie de signalisation classiquement activée est celle dépendante de Myd88 qui va induire une réponse inflammatoire de type cytokines suite à l'activation de NFκB. Mais TLR4 est également capable d'induire une signalisation Myd88-indépendante. Dans ce dernier cas, l'activation de la voie TRAM-TRIF nécessite l'internalisation du récepteur et de son ligand dans un endosome primaire avant que la signalisation ne démarre réellement [100]. Elle aboutira au final à la translocation nucléaire de NFκB mais également à celle du facteur de transcription IRF3 (Interferon Regulatory Factor

3) pour induire une réponse interféron de type 1 (Voir la revue de McGettrick et O'Neill [99] et la figure 1.11).

TLR4 est un récepteur exprimé par la plupart des cellules immunitaires comme les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages, les granulocytes ainsi que les lymphocytes B et T. Il est également présent sur d'autres types cellulaires comme certaines cellules épithéliales ou bien comme il sera décrit dans ce manuscrit, sur des cellules endothéliales [86].

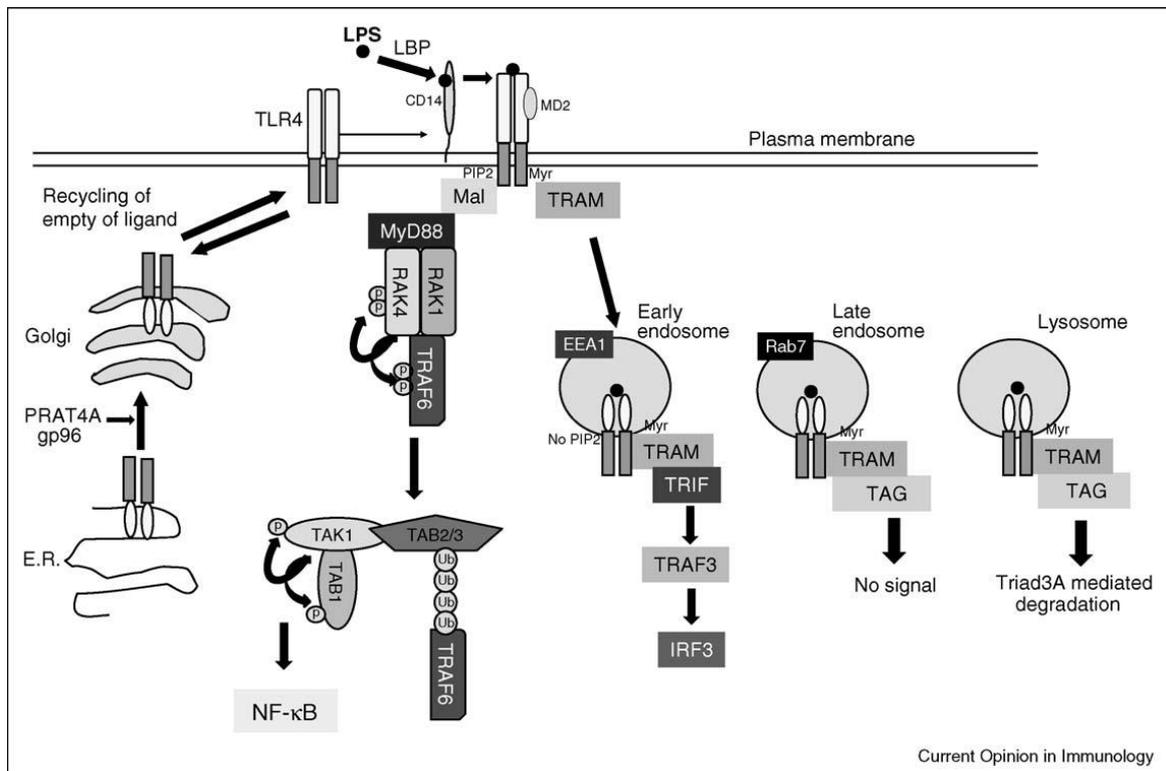


Figure 1.11. Schéma montrant la localisation, le trafic et les 2 voies de signalisation intracellulaires du récepteur TLR4. Le récepteur trafique entre l'appareil de Golgi et la membrane jusqu'à son engagement par un ligand. L'engagement fait éventuellement intervenir le corécepteur CD14 et la LBP. TLR4 signale ensuite soit par la voie Myd88 soit par la voie TRAM-TRIF qui nécessite dans ce cas l'internalisation du récepteur et du ligand. (d'après McGettrick et O'Neill, 2010 [99]).

1.4.2. Le système immunitaire adaptatif

Le système immunitaire adaptatif a pour rôle d'aider et de prendre le relais du système immunitaire inné lorsque ce dernier n'est pas suffisant à l'élimination d'un pathogène. Il a également pour rôle le maintien d'une mémoire immunitaire suite à la rencontre de certains pathogènes. Son action est plus spécifique que celle du système inné mais prend plus de temps à se mettre en place. Elle repose principalement sur 2 types de cellules effectrices, les lymphocytes B et T. Ces cellules sont capables de reconnaître des antigènes spécifiques présentés par des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les antigènes endogènes sont présentés par les molécules du CMH de classe 1 exprimé par quasiment toutes les cellules de l'organisme. Les antigènes d'origine exogène sont présentés par les molécules du CMH de classe 2 uniquement exprimé par les cellules présentatrices d'antigène (CPA). Ainsi, les CPA comme les cellules dendritiques établissent un lien entre l'immunité innée et adaptative par leur capacité à reconnaître un pathogène, le dégrader et apprêter des antigènes qu'elles vont ensuite présenter aux lymphocytes pour initier une réaction immunitaire spécifique.

Les lymphocytes T sont capables de reconnaître une large gamme de complexes peptide - molécule du CMH grâce à la grande diversité de leurs TCR (T Cell Receptor) produits par recombinaison génétique au cours de leur maturation dans le Thymus. Ils peuvent avoir différents rôles comme la destruction directe des cellules infectées (lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques) après reconnaissance d'un complexe peptide - molécule du CMH de classe 1. Ils peuvent également avoir un rôle de médiateurs de la réponse immunitaire (lymphocytes T CD4⁺ helpers) en sécrétant diverses cytokines suite à la reconnaissance de complexes peptide - molécule du CMH de classe 2 et en activant les lymphocytes B.

Les lymphocytes T helpers se divisent généralement en 2 catégories suivant le type de réaction immunitaire qu'ils sont capables d'initier :

- Les Th1 sont associés à une réponse de type Interféron γ et vont favoriser l'immunité à médiation cellulaire en stimulant les macrophages et les cellules T CD8⁺ cytotoxiques.
- Les Th2 sont eux associés à l'immunité à médiation humorale puisqu'ils vont surtout produire des cytokines permettant la maturation des lymphocytes B et favoriser au final la production d'anticorps.

Contrairement aux lymphocytes T, les lymphocytes B sont capables de reconnaître des antigènes solubles qui n'ont pas besoin d'être présentés en complexe avec des molécules du CMH grâce à leur BCR (B Cell Receptor). Un lymphocyte B naïf peut être activé directement après avoir rencontré un antigène par exemple lorsqu'il y a costimulation du BCR et d'un TLR mais l'activation peut aussi être dépendante d'un contact avec un lymphocyte T spécifique du même antigène (formation d'une synapse immunologique entre les 2 cellules). Dans tous les cas, la combinaison des différents signaux d'activation conduit *in fine* à la différenciation du lymphocyte B en plasmocyte sécréteur d'anticorps. Ces cellules sont donc impliqués dans l'immunité à médiation humorale et produisent des anticorps spécifiques d'un pathogène facilitant ensuite son élimination par exemple par des cellules phagocytaires.

1.5. Endothélium et inflammation

L'endothélium vasculaire joue un rôle important dans la plupart des phénomènes inflammatoires et immunitaires innés ou adaptatifs [101]. Il existe également des études montrant que les cellules endothéliales pourraient se comporter (*in vitro*) comme des cellules présentatrices d'antigènes puisqu'elles peuvent exprimer des molécules du CMH de classe 2 mais ces phénomènes ne seront pas discutés dans ce manuscrit. Les cellules endothéliales sont en contact direct avec les pathogènes potentiels en circulation dans le sang et sont capables de les détecter puisqu'elles possèdent de nombreux PRR à leur surface ainsi que dans leur cytoplasme [102]. Les cellules endothéliales sont donc capables de déclencher une réponse inflammatoire en particulier par la production de certaines cytokines. Elles jouent également un rôle crucial dans la régulation des phénomènes de migration trans-endothéliale des cellules immunitaires vers le foyer d'une infection en leur permettant (ou non) le passage du sang vers l'espace péri-vasculaire.

1.5.1. Cytokines et cellules endothéliales

En réponse à des stimuli provenant des PRR et principalement à l'activation de la voie NF κ B, les cellules endothéliales sont capables de produire différentes cytokines et

chimiokines. Cette section présentera quelques unes des principales cytokines produites par les cellules endothéliales dont certaines ont fait l'objet de l'étude présentée dans ce manuscrit.

- L'IL-6 : L'interleukine 6 est un des principaux médiateurs de la phase aiguë de la réponse inflammatoire. Elle est connue pour être sécrétée en réponse à des PRR tels que les TLR et induit des réactions inflammatoires comme la fièvre. Elle stimule également le développement des lymphocytes B et des neutrophiles.

- Le TNF- α : Le TNF- α (Tumor Necrosis Factor) est une cytokine ayant des effets sur de nombreuses fonctions physiologiques et capable d'activer la voie NF κ B mais également des cascades des signalisations par la voie des MAP kinases jouant ainsi un rôle sur les phénomènes de prolifération de différenciation et d'apoptose. C'est un médiateur important de la réponse inflammatoire aiguë, qui induit de la fièvre, et une augmentation de la production de CRP dans le foie (la C Reactive Protein est une protéine jouant un rôle dans l'activation du système du complément). Le TNF- α peut également avoir une fonction de chimioattractant pour les neutrophiles et d'activateur de la phagocytose pour les macrophages. Enfin il est intéressant de noter que le TNF- α induit une surexpression des molécules d'adhésion impliquées dans la diapédèse à la surface des cellules endothéliales.

- L'IL-8 : L'interleukine 8 est une chimiokine impliquée dans la réponse inflammatoire. Elle est produite par les cellules endothéliales et plus généralement par toutes les cellules qui peuvent répondre aux stimuli des TLR. L'IL-8 est capable d'agir comme un facteur pro-angiogénique mais elle exerce principalement un rôle chimioattractant lors de l'inflammation en attirant les neutrophiles, les basophiles et les lymphocytes T (mais pas les monocytes) vers le lieu où l'infection est détectée. Elle joue également un rôle dans l'activation des neutrophiles.

- MCP-1 : MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1) est connue pour être la principale chimiokine impliquée dans le recrutement des monocytes sur le site d'infection mais elle est également capable d'attirer les lymphocytes T et les cellules dendritiques.

1.5.2. La migration trans-endothéliale (diapédèse)

L'inflammation de l'endothélium provoque la migration trans-endothéliale des cellules immunitaires aussi appelée diapédèse. C'est un phénomène important pour le fonctionnement des réactions immunitaires. Ce phénomène a également lieu en conditions normales (non inflammatoires) afin d'assurer une surveillance immunitaire du milieu péri-vasculaire et des différents organes mais dans des proportions moindres qu'en conditions inflammatoires. La diapédèse proprement dite désigne l'événement de migration d'un leucocyte à travers l'endothélium mais plusieurs étapes la précèdent. Elles permettent à un leucocyte circulant dans le flux sanguin de s'arrêter et de traverser l'endothélium au niveau d'un site d'inflammation locale pour ensuite pouvoir migrer dans l'espace péri-vasculaire et se rendre à l'endroit où un pathogène aura été détecté (ou simplement à des fins de surveillance).

La première étape, dite de capture, correspond à une adhésion faible qui va permettre de stopper le leucocyte circulant. Cette adhésion transitoire se fait principalement par des interactions entre les sélectines et leurs ligands. Les sélectines sont des protéines membranaires exprimées par les leucocytes (P-sélectine) et par les cellules endothéliales activées (E et L-sélectine). Sur ces dernières, le niveau d'expression des sélectines dépend du niveau d'activation et donc du contexte inflammatoire.

Pendant cette première étape d'adhésion, le leucocyte continue de rouler le long des cellules endothéliales sous l'effet du flux sanguin qui induit des contraintes de cisaillement. Ces contraintes de flux sont d'ailleurs nécessaires pour que l'adhésion se déroule correctement. Au cours de l'étape de roulement, le leucocyte peut être activé par différentes cytokines et chimiokines sécrétées par les cellules endothéliales ou déposées à leur surface par d'autres cellules comme les plaquettes [103]. L'activation du leucocyte au cours du roulement induit une augmentation de l'avidité des intégrines exprimées à sa surface pour leurs ligands qui se trouvent à la surface des cellules endothéliales. C'est ce phénomène qui va provoquer l'arrêt du leucocyte.

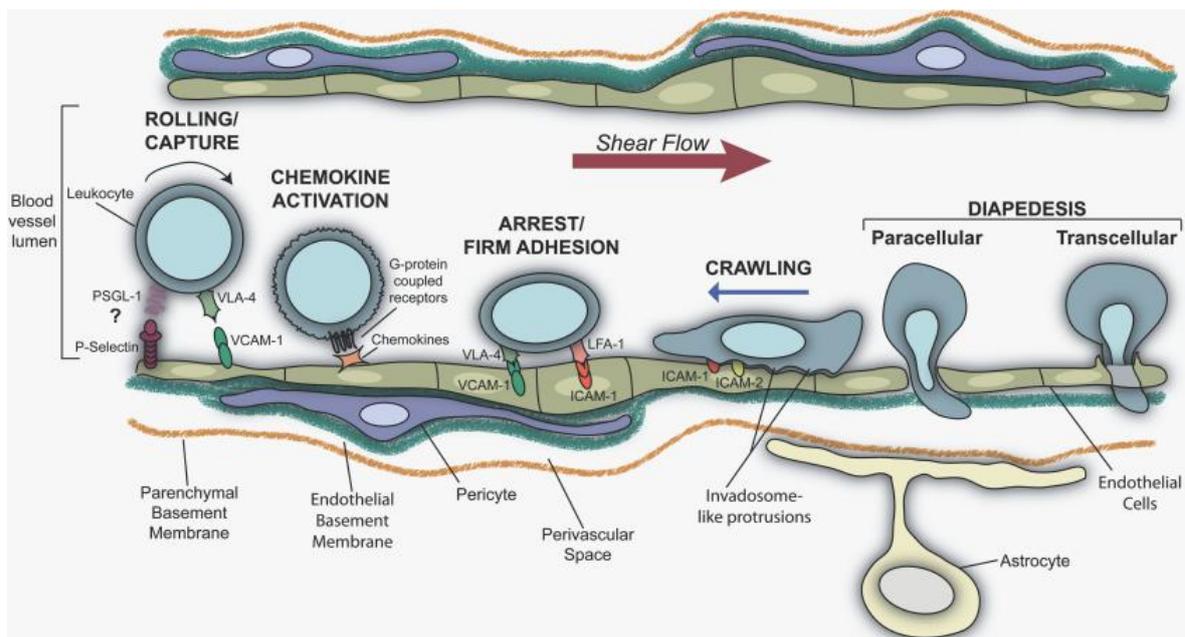


Figure 1.12. Schéma montrant les différentes étapes de capture et d'adhésion d'un leucocyte par l'endothélium ainsi que les principales molécules impliquées à chaque étape. Le processus se termine par l'étape de diapédèse, c'est à dire la migration para-cellulaire ou trans-cellulaire du leucocyte. D'après Greenwood et al. 2011[104].

Les cellules endothéliales expriment en effet à leur surface des molécules d'adhésion (CAMs : Cell Adhesion Molecules) capables d'interagir avec les intégrines des leucocytes activés et d'induire une adhésion ferme entre les leucocytes et les cellules endothéliales. Les principales molécules d'adhésion exprimées par l'endothélium sont ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1 aussi désignée par CD54) et VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1 aussi désignée par CD106). Ces deux protéines appartiennent à la superfamille des immunoglobulines et leur niveau d'expression est largement fonction du contexte inflammatoire. Les cellules endothéliales peuvent répondre à différentes cytokines comme le TNF- α en surexprimant les molécules d'adhésion et le même phénomène se produit en réponse à la stimulation des PRR présents à leur surface ou dans leur cytoplasme. Les ligands respectifs d'ICAM-1 et VCAM-1 exprimés par les leucocytes sont LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen 1) et VLA-4 (Very Late Antigen 4), toutes deux de la famille des intégrines. Le leucocyte ayant adhéré à l'endothélium, les molécules d'adhésion vont induire

une signalisation permettant de démarrer la migration trans-endothéliale proprement dite selon deux voies différentes :

- La migration para-cellulaire : Dans cette situation, la signalisation en aval des molécules d'adhésion induit une ouverture et un remodelage des jonctions serrées et adhérentes par une modification rapide du niveau d'expression à la surface des cellules de certaines molécules comme PECAM-1 [105] ou la VE-cadhérine ce qui permet au leucocyte de migrer au niveau des jonctions cellule-cellule. Ce mode de migration représente la majorité des cas.
- La migration trans-cellulaire : Dans certains cas, il peut arriver qu'un leucocyte ne migre pas au niveau des jonctions cellule-cellule mais directement à travers la cellule elle-même. Ce mode de migration, plus rare, implique également une signalisation par les molécules d'adhésion mais aussi une relocalisation de certaines protéines impliquées dans la formation des jonctions comme PECAM-1 ou JAM-A qui viennent accompagner le leucocyte au cours de la migration.

Après la diapédèse, une dernière étape va permettre au leucocyte de traverser la membrane basale. Cela se fait grâce aux intégrines présentes à la surface du leucocyte qui lui permettent d'interagir avec les protéines de la matrice extracellulaire mais également par l'expression de protéases appelées MMP (Matrix Metalloproteinase) capables de dégrader la membrane basale afin que le leucocyte puisse s'y frayer un chemin. Les MMP jouent non seulement un rôle dans la dégradation de la matrice extracellulaire mais permettent également une modulation du comportement des cellules immunitaires en cours de migration puisqu'elles sont aussi capables d'activer ou d'inactiver certaines cytokines [106]. On citera par exemple l'importance des MMP 2 et 9 qui jouent un rôle pour l'entrée des leucocytes dans l'espace péri-vasculaire dans le modèle murin de la SEP [107]. (Voir les revues de Muller et al. 2011 [108] et Ley et al. 2007 [109] pour une description plus détaillée des mécanismes de migration trans-endothéliale et la revue de Greenwood et al. 2011 [104] pour un focus au niveau de la BHE).

1.7. Objectifs de la thèse

L'objectif des travaux présentés ici était d'étudier *in vitro* si l'enveloppe du rétrovirus MSR/V exerçait une activité pro-inflammatoire sur l'endothélium vasculaire principalement au niveau de la barrière hémato-encéphalique mais également au niveau de l'endothélium classique. En effet, les études précédentes ont montré sa présence chez les patients atteints de SEP [12, 14, 110] et certaines formes de schizophrénie [11, 15, 111] et son action pro-inflammatoire a déjà été démontrée sur des cellules immunitaires [34, 50] mais jamais au niveau de l'endothélium.

Le rôle des rétrovirus endogènes et en particulier celui du MSR/V dans la pathogenèse de la SEP n'est pas encore communément admis mais les preuves s'accumulent [112]. Cette étude pourrait permettre d'apporter une preuve supplémentaire de ses effets et appuyer ainsi l'hypothèse selon laquelle il prendrait part au développement de la maladie. Les traitements actuellement disponibles s'attachent à traiter les symptômes de la SEP plutôt que de s'attaquer aux causes qui restent mal connues. S'il était admis que le MSR/V puisse être un facteur déclenchant de l'inflammation ou bien jouant un rôle dans le maintien d'un niveau inflammatoire élevé, cela ouvrirait la voie vers de nouvelles stratégies thérapeutiques curatives et non plus palliatives. Une approche ciblant le MSR/V par des anticorps monoclonaux est en cours de développement et la phase 1 des essais cliniques a été achevée récemment.

L'étude a été réalisée en suivant 2 axes majeurs d'investigation. Le premier concerne l'étude des effets des enveloppes rétrovirales sur les deux modèles choisis d'endothélium vasculaire. Dans un premier temps, nous avons cherché à analyser la réponse inflammatoire du modèle HCMEC/D3 en réponse à l'enveloppe recombinante du MSR/V et à la syncytine en analysant l'expression de molécules d'adhésion et la production de cytokines et en effectuant des tests fonctionnels. Le même type d'analyse a été conduit sur le modèle HUVEC mais de manière moins poussée. La deuxième partie de l'étude a été conduite uniquement sur le modèle HCMEC/D3 et concerne les voies d'activation empruntées par ces enveloppes rétrovirales pour induire une réponse inflammatoire des cellules endothéliales.

Les points suivants ont été abordés :

Propriétés pro-inflammatoires du MSR/V et syncytine :

- Analyse de l'expression d'ICAM-1 et de la production de cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-8 et TNF- α en réponse à l'enveloppe du MSR/V et à la syncytine recombinantes sur les HCMEC/D3.
- Analyse de l'adhérence entre les cellules endothéliales HCMEC/D3 et les cellules immunitaires suite au traitement par les enveloppes recombinantes.
- Essais visant à reproduire les expériences de neutralisation de l'effet de l'enveloppe recombinante par des anticorps monoclonaux pour démontrer sa spécificité d'action.
- Analyse de l'effet des enveloppes lorsqu'elles sont exprimées de façon endogène après transfection dans des cellules HCMEC/D3.
- Analyse de l'effet des enveloppes rétrovirales sur les paramètres inflammatoires du modèle HUVEC.

Etudes des voies d'activation :

- Mise en évidence et localisation du récepteur TLR4 supposé reconnaître les enveloppes rétrovirales sur le modèle HCMEC/D3.
- Inhibition du récepteur par une approche de *Knock down* en utilisant des siRNAs.
- Analyse de la réponse inflammatoire du modèle HCMEC/D3 après *Knock down* du récepteur TLR4.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

2.1. Protéines d'enveloppes recombinantes

2.1.1. Enveloppe du MSRV (Env-ms)

La protéine appelée Env-ms utilisée dans cette étude est l'unité de surface soluble (ENV-SU) de la protéine d'enveloppe complète du MSRV (ENV pV14 N° d'accès GenBank : AF331500). Le poids moléculaire de cette unité de surface est de 33 kDa pour une longueur de 293 acides aminés. L'organisation des protéines ENV-SU et ENV pV14 est représentée sur la figure 1.4 dans la section 1.1.3. Les domaines de la protéine complète et de l'unité de surface sont présentés sur la figure 2.1.

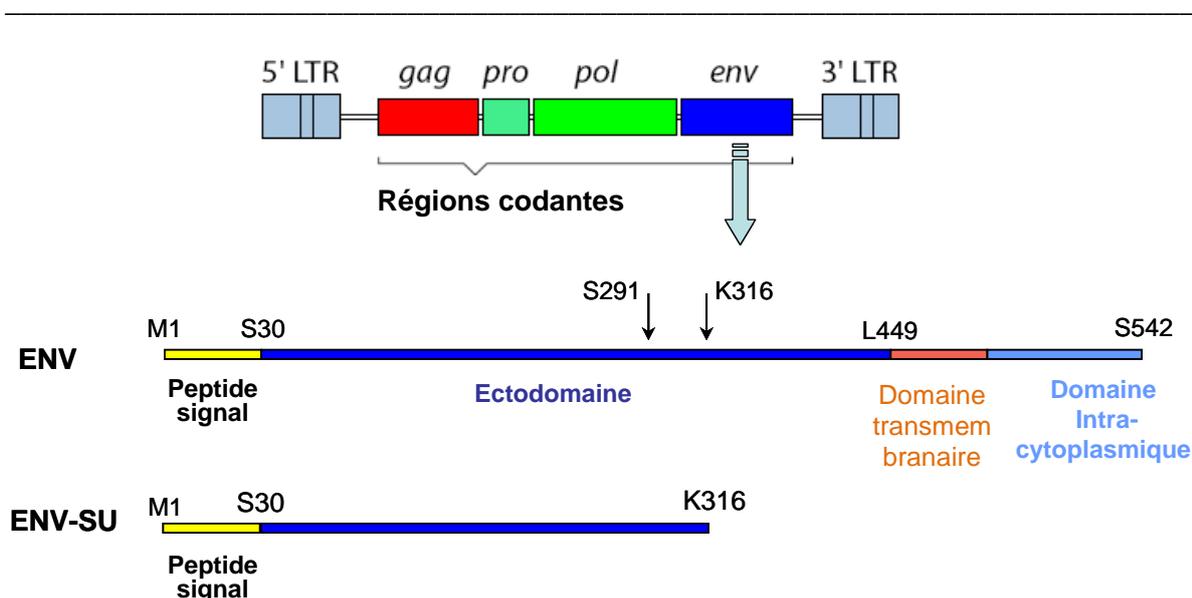


Figure 2.1. Schéma représentant l'organisation génomique d'un rétrovirus et détail de la protéine d'enveloppe du MSRV sous sa forme complète (ENV) et de l'unité de surface (ENV-SU) qui a été produite sous forme recombinante et utilisée tout au long de cette étude. Les sites de clivage en position 291 et 316 sont indiqués par des flèches noires.

L'enveloppe recombinante du MSR_V a été produite et purifiée par la société PX Therapeutics (Grenoble, France) selon un protocole déjà publié [34] en utilisant le vecteur d'expression pET-15b (Novagen, Merck) et des cellules *Escherichia coli* de souche AD494 (DE3). En résumé, les cellules sont traitées avec de l'IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) et cultivées à 37°C. Les cellules sont ensuite centrifugées et le culot lavé. Le culot est ensuite resuspendu dans un tampon de lavage contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics) puis soniqué. Le lysat ainsi obtenu est ensuite centrifugé et le culot contenant les corps d'inclusion est remis en suspension dans un tampon contenant des inhibiteurs de protéases. Après centrifugation, le culot est lavé en présence de 2% de Triton X-100 puis lavé de nouveau afin d'éliminer le détergent. Les corps d'inclusion sont solubilisés en présence d'urée 8M avant d'être centrifugés. Le surnageant est dilué dans un tampon Tris-HCl (pH 8) contenant 1mM de 2-mercaptoéthanol (2-ME) et chargé sur une colonne « Chelating Sepharose Fast Flow » (Amersham Biosciences) pour une purification en conditions dénaturantes. ENV-SU est ensuite récupérée par dialyse contre un tampon Tris (pH 7) 50mM, NaCl 300mM, 2-ME 1mM, sucrose 2%, glycérol 2% et urée 2M. Dans ces conditions, la protéine reste soluble. La séquence d'acides aminés de la protéine purifiée est ensuite analysée par une dégradation d'Edman et est en accord avec la séquence connue. Des aliquots à 50µg/ml sont ensuite congelés rapidement dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C. La protéine est ensuite analysée par SDS-PAGE et spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 2.2). Enfin, la protéine recombinante est testée pour la présence d'endotoxines par un test LAL (*limulus amoebocytes lysate*) réalisée par CleanCells et toutes les fractions sont en dessous du seuil de détection de 5UI/ml.

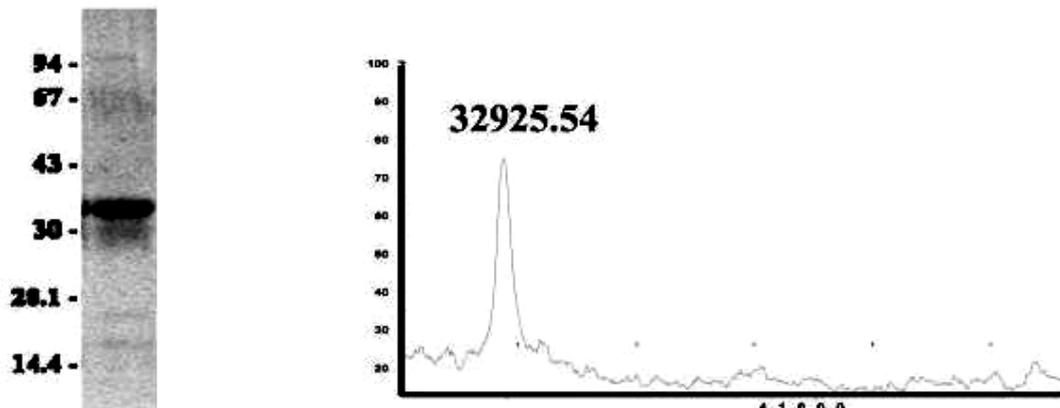


Figure 2.2. Analyse par SDS-PAGE (gauche) et par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) de la protéine recombinante *Env-ms* (ENV-SU) purifiée.

2.1.2. Enveloppe HERVWE1 (Env-syn ou syncytine)

La protéine recombinante syncytine 1 humaine (ENV pH74 N° d'accès GenBank : AF072506 également désignée par Env-syn) présentée ici a été produite et purifiée dans les mêmes conditions que l'unité de surface recombinante du MSRVS par PX Therapeutics (Grenoble). Elle possède plus de 93% d'identité avec cette dernière au niveau de sa séquence en acides nucléiques et 87,3% d'identité pour les séquences en acides aminés (Figure 1.4).

2.1.3. Anticorps anti-enveloppe

Lors des expériences visant à déterminer la spécificité de l'action pro-inflammatoire de l'enveloppe Env-ms, avant la stimulation des cellules, l'enveloppe recombinante a été pré-incubée pendant 40 minutes avec des anticorps monoclonaux dirigés contre cette enveloppe (anticorps monoclonaux de souris IgG1 : clone 13H5A5 et IgG2a clone 3B2H4 fournis par BioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

2.2. Cellules est conditions de culture

2.2.1. Cellules HCMEC/D3

Les cellules de la lignée HCMEC/D3 ont été obtenues grâce au Dr Pierre Olivier Couraud (Institut Cochin, Paris, France) et cultivées comme décrit précédemment [81] à 37°C et 5% de CO₂. En résumé, les cellules ont étéensemencées dans des flasques en plastique fonctionnalisées avec du collagène de type 1 à 0,1 mg/ml provenant de queues de rats (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) pendant au moins 10 minutes à température ambiante. Les cellules sont cultivées dans du milieu EBM-2 supplémenté (Lonza « Bullet Kit », Bâle, Suisse) contenant 2,5% de sérum de veau fœtal (SVF) et des facteurs de croissance, bFGF (basal Fibroblast Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), IGF (Insulin-like Growth Factor) et EGF (Epidermal Growth Factor) tous introduits à une concentration finale 4 fois plus faible que celle recommandée par le fournisseur. Les cellules ont été obtenues à 26 passages et les expériences ont été réalisées jusqu'au 36ème passage.

A confluence les cellules sont lavées 2 fois au PBS 1X puis détachées avec une solution de trypsine-EDTA à 0,05% (Gibco) puis réensemencées en milieu complet ou utilisées pour les expériences.

2.2.2. Cellules HUVECs

Les cellules HUVECs ont été isolées localement par traitement à la collagénase selon de le protocole de Jaffe et al.[113]. Les cultures primaires de cellules HUVECs sont incubées à 37°C et 5% de CO₂ et se font dans du milieu M199 contenant 20% de SVF décomplémenté, 50µg/ml d'ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement), 100µg/ml d'héparine, 100U/ml de pénicilline, 100µg/ml de streptomycine et 0,25µg/ml de Fungizone (Sigma). Une fois confluentes, les cellules sont détachées de la même façon que les HCMEC/D3 et cultivées jusqu'à environ 5 passages.

2.2.3. Cellules HL-60

Les cellules HL-60 (Human promyelocytic leukemia cells) ont été utilisées pour les tests d'adhésion après induction et différenciation en monocytes. C'est une lignée de promyélocytes capables de se différencier en granulocytes, monocytes, macrophages ou éosinophiles selon les facteurs que l'on ajoute dans le milieu de culture. Ces cellules ont été cultivées en suspension à 37°C et 5% de CO₂ dans du milieu RPMI 1640 contenant 10% de SVF et des antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Les cellules sont réensemencées 2 fois par semaine par une dilution au 1/4 dans du milieu frais.

2.3. Essais de stimulation

Pour les expériences de stimulation, les cellules HCMEC/D3 ou HUVEC ont été ensemencées sur des plaques 24 puits fonctionnalisées avec du collagène de type 1 jusqu'à atteindre la confluence. Le milieu a ensuite été remplacé par du milieu contenant les protéines recombinantes, du TNF- α , classiquement utilisé à 100U/ml (ce qui correspond ici à une concentration de 5pg/ml) ou du LPS à différentes concentrations et les cellules sont laissées à incuber pour la nuit avant les différentes analyses. Toutes les conditions sont testées en triplicatas. Lors des essais de neutralisation par des anticorps, la protéine d'enveloppe a été traitée pendant 40 minutes et à 4°C par les anticorps monoclonaux anti-enveloppe 3B2H4 ou 13H5A5 à 30 μ g/ml et le mélange anticorps-protéine a ensuite été mis en présence des cellules. Après la stimulation, les cellules sont trypsinées et analysées pour l'expression d'ICAM-1 et les surnageants sont collectés, congelés à -80°C en attente d'être analysés pour la présence de cytokines par des tests ELISA.

2.4. Dosage des cytokines (ELISA)

Les surnageants de culture à tester sont décongelés juste avant le dosage et dilués dans une solution de PBS Tween-20 0,05%, BSA 0,1% à des ratios allant de 1/2 à 1/30 suivant le type de cytokine analysée et le type de traitement subi par les cellules. Le test ELISA (Enzyme

Linked Immunosorbent Assay) est ensuite réalisé en utilisant des kits PromoKine spécifiques à chaque cytokine étudiée et en suivant les recommandations du fournisseur (Promocell).

Chaque échantillon est déposé en triplicata sur une plaque 96 puits. La lecture finale se fait sur un spectrophotomètre Victor 3 (1420 multilabel counter, Perkin Elmer) par une lecture d'absorbance à 405nm.

2.5. Tests d'adhésion

Pour les tests d'adhésion, des cellules HL-60 sont d'abordensemencées à une concentration de $2 \cdot 10^5$ cellules/ml et activées avec de la vitamine D3 à 18,7µg/ml (Sigma-Aldrich) et de l'indométhacine à 10^{-7} M (Sigma-Aldrich) pendant au moins 3 jours. Les cellules sont ainsi induites à se différencier en monocytes et le signe d'une bonne induction est l'adhérence d'une partie des cellules à la flasque de culture. Puisque l'activation des cellules induit une adhésion, elles sont ensuite détachées avec un racleur puis marquées avec de la calcéine AM à 1µM (Invitrogen Molecular probes, Carlsbad, CA, USA) juste avant l'expérience (la calcéine devient fluorescente après incorporation par les cellules). Le test se fait ensuite en plaque 12 puits où chaque puits contient une monocouche de cellules HCMEC/D3 représentant une surface d'environ $3,8\text{cm}^2$. On ajoute dans chaque puits $1 \cdot 10^6$ cellules qui sont laissées à adhérer sur la monocouche (préalablement stimulée pendant une nuit avec Env-ms ou du LPS) pendant 35 minutes à 37°C. Le milieu est ensuite enlevé et la monocouche rincée 3 fois avec du PBS 1X pour enlever les cellules non adhérentes. On ajoute ensuite une solution de SDS 1% dans de l'eau dans chaque puits afin de lyser les cellules et libérer la calcéine fluorescente. Pour chaque condition, le lysat est déposé en triplicatas sur une plaque 96 puits et on réalise enfin une lecture de la fluorescence pour chaque puits avec un lecteur de plaques (Perkin Elmer).

2.6. Immuno-marquages et cytométrie en flux

Après détachement à la trypsine, les cellules vivantes sont centrifugées puis le culot est repris dans 100µl de milieu RPMI 1640, contenant 10% de SVF et l'anticorps primaire anti-ICAM-1 (clone 2D5 produit localement et décrit précédemment [114] à une concentration de

5µg/ml. Les cellules sont laissées à incuber avec l'anticorps primaire pendant 30 minutes à 4°C. Après ajout de 500µl de milieu RPMI 1640, 10%SVF, les cellules sont centrifugées, le surnageant éliminé et le culot est repris dans 50µl de milieu RPMI 1640, 10%SVF contenant un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome FITC (chèvre anti-souris couplé au FITC, produit par Jackson ImmunoResearch, Philadelphie, PA, USA). Les cellules sont laissées à incuber pendant 15 minutes à 4°C. On ajoute ensuite 500µl de milieu RPMI 1640, 10%SVF et après une dernière étape de centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 500µl de milieu RPMI 1640, 10%SVF avant l'analyse en cytométrie en flux.

Les cellules marquées sont analysées par cytométrie en flux soit avec un cytomètre FACSCAN (Beckton Dickinson, Le-Pont-De-Claix, France) dans ce cas, les données sont analysées avec le logiciel WinMDI ; soit avec un cytomètre Accuri C6 (Beckton Dickinson) et dans ce cas les données sont analysées avec le logiciel CFlow plus.

Lors de l'analyse la procédure utilisée classiquement consiste à repérer la population de cellules vivantes sur des paramètres de taille (FSC : Forward Scatter) et de granulosité (SSC : Side Scatter) ce qui permet de définir la fenêtre d'analyse.

La valeur caractéristique qui a ensuite servi aux différentes analyses est la moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence pour la population de cellules sélectionnée. Cependant, pour pouvoir comparer les résultats d'expériences indépendantes réalisées sur les 2 cytomètres différents, les données sont souvent exprimées en facteur d'augmentation par rapport à une population de cellules non traitées à laquelle on attribue la valeur 1.

2.7. Immuno-marquages et microscopie de fluorescence

Pour les expériences de microscopie, les cellules ont étéensemencées sur des systèmes de lames de culture Labtek (Nunc, Rochester, NY, USA) préalablement fonctionnalisées avec du collagène pendant au moins une heure à 37°C. Suivant le type de marquage, les cellules sont cultivées jusqu'à confluence (marquages d'ICAM-1 ou des protéines de jonctions) ou de façon à observer des cellules individualisées environ 24h après ensemencement (marquages de TLR4 et de l'appareil de Golgi).

Si les cellules sont stimulées, la stimulation se fait sur la nuit directement dans les chambres de culture LabTek.

Le protocole de fixation utilisé ensuite est optimisé pour préserver les jonctions cellulaires mais il a aussi été utilisé lorsque les cellules ne formaient pas de monocouches. En résumé, les cellules sont d'abord lavées 2 fois rapidement avec du PBS contenant du calcium et du magnésium (PBS Ca Mg). Elles sont ensuite fixées pendant 30 minutes à 37°C avec une solution de PBS Ca Mg contenant 2% de paraformaldéhyde et 2% de sucrose. Après fixation, les cellules subissent 2 étapes de « quenching » pendant 10 minutes à températures ambiante en les incubant dans une solution de PBS Ca Mg contenant 0,1M de glycine et 0,01% de NaN₃. Les cellules sont ensuite perméabilisées pendant 20 minutes à température ambiante en utilisant une solution de PBS Ca Mg contenant 0,2% de saponine et 2% de BSA.

Les étapes de marquage se font ensuite en utilisant différents anticorps primaires et secondaires.

Anticorps primaires :

- Anti-ICAM-1 clone 2D5 (Cf 2.5) utilisé à 5µg/ml.
- Anti-TLR4 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) : Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la le récepteur TLR4 humain. Utilisé dilué au 1/100eme.
- Anti-golgine-97 (Invitrogen) : Anticorps monoclonal de souris dirigé contre une protéine présente dans la membrane périphérique de l'appareil de Golgi. Utilisé dilué au 1/100eme.
- Anti PECAM-1 (produit localement) : Anticorps monoclonal de souris (clone SF-410) dirigé contre la protéine de jonction PECAM-1. Surnageant de culture utilisé non dilué.
- Anti VE-cadhérine (produit localement) : Anticorps monoclonal de souris (clone TEA) dirigé contre la protéine de jonction VE-cadhérine. Surnageant de culture utilisé non dilué.

Anticorps secondaires :

- Anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé au TRITC (Jackson ImmunoResearch), utilisé dilué au 1/100eme.
- Anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé Alexa 488 (Molecular Probes), utilisé dilué au 1/100eme.

- Anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé Alexa 555 (Molecular Probes), utilisé dilué au 1/100ème.

Tous les anticorps primaires et secondaires qui ont été dilués l'ont été dans la même solution que celle utilisée pour l'étape de perméabilisation et les cellules sont laissés à incuber pendant une heure à température ambiante pour chaque anticorps. Les noyaux sont également colorés en utilisant du bleu de Hoechst dilué au 1/10000ème lors de l'incubation avec les anticorps secondaires. Entre chaque incubation, on réalise 3 lavages de 5 minutes avec la solution de perméabilisation.

Après les dernières étapes de lavage, la lame est rincée à l'eau distillée puis le montage s'effectue avec du milieu de montage Dako puis laissée polymériser une nuit à température ambiante et enfin stockée à 4°C et à l'obscurité jusqu'à l'analyse.

Les préparations sont enfin observées avec un microscope à épi-fluorescence Karl Zeiss AxioImager. Pour les analyses de co-localisation, les observations se font en plus avec le module d'analyse pseudo-confocal APOTOME qui permet d'obtenir une image d'un plan focal donné à l'intérieur de la cellule de façon comparable à un microscope confocal classique.

Les images sont analysées superposées et colorées avec le logiciel ImageJ (ImageJ, NIH, USA). Pour les analyses de co-localisation, le calcul des coefficients de corrélation de Pearson (Rr) et le coefficient de superposition de Mander (R) se fait en utilisant le plugin de co-localisation d'ImageJ après soustraction du bruit de fond.

2.8. SDS-PAGE et Western blots

2.7.1. Extraction des protéines totales

Après avoir subi les différents traitements, les cellules sont détachées par la trypsine, centrifugées, puis le culot est lavé 2 fois avec du PBS 1X. Le culot est ensuite repris dans un tampon Tris-HCl 50mM, pH 7,5, NaCl 150mM contenant 1% de NP40 et 0,1% de SDS si mentionné ainsi qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich) et la lyse se fait

pendant 30 minutes à 4°C. Le lysat est ensuite centrifugé à 13000 rpm pour éliminer les débris cellulaires puis le surnageant est récupéré et congelé à -80°C jusqu'à l'analyse.

2.7.2. SDS-PAGE

Avant de les faire migrer sur un gel de polyacrylamide, les échantillons sont d'abord dénaturés en les diluant dans un tampon de Laemmli (Tris - HCl 60mM pH 6,8, 2% SDS, 10% glycérol, 5% β -mercaptoéthanol, 0,01% bleu de bromophénol). Puis en les incubant pendant 10 minutes à 95°C.

Les échantillons dénaturés sont ensuite déposés sur un gel de concentration (3,8% d'acrylamide, pH 6,8) puis séparés sur un gel de séparation (10% d'acrylamide, pH 8,8), en présence de SDS. La migration s'effectue à 200 Volts pendant environ une heure.

2.7.3. Transfert et immuno-révélation

Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane PVDF pendant une heure à 100 Volts. La membrane est ensuite rincée 2 fois avec un tampon PBS contenant 0,1% de Tween 20 puis incubée pendant une nuit dans une solution de saturation constituée de PBS Tween 20 0,1% et 5% de lait écrémé. La membrane est lavée 3 fois 5 minutes par du PBS Tween 20 0,1% sous agitation puis incubée avec les anticorps primaires puis secondaires pendant 2 heures et avec une étape de lavage entre chaque incubation.

Anticorps utilisés :

- Anti-TLR4 : Cf 2.6
- Anti-actine (Sigma-Aldrich) : Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre l'actine des cellules de vertébrés. Utilisé dilué au 1/800ème
- Anti-IgG de lapin couplé HRP (Invitrogen) : Anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre les IgG de lapin et couplé à une peroxydase. Utilisé dilué au 1/10000ème.

Tous les anticorps sont dilués dans du PBS Tween 20 0,1%, 5% de lait écrémé.

Après la dernière incubation, la membrane subit un cycle de 3 rinçages puis une étape de révélation qui produit de la lumière au niveau où sont fixés les anticorps par réaction de la

HRP avec un substrat chimioluminescent (Amersham ECL+). Les photos de la membrane sont prises avec un appareil spécifique (Chemidoc BioRad) et analysées puis quantifiées grâce au logiciel Image Lab (BioRad).

2.9. siRNAs et transfections

Les siRNAs visant à établir un *Knock-down* transitoire du récepteur TLR4 ont été transfectés selon les recommandations du fabricant (Invitrogen). Les cellules sontensemencées la veille de la première transfection sur des plaques 24 puits fonctionnalisées avec du collagène de type 1 et de manière à ce qu'elles soient à environ 30% de confluence le jour de la transfection. Le milieu de culture est alors remplacé par du milieu Opti-MEM le temps de la transfection. On transfecte ensuite un mélange de 3 siRNAs ciblant TLR4 (Stealth RNAi HSS 186357, HSS 110820 et HSS 110819 tous fournis par Invitrogen) ainsi qu'un siRNA servant de contrôle négatif à une concentration finale de 20nM par puits en utilisant un agent de transfection chimique (RNAiMAX, Invitrogen, 1µl/puits). Les siRNAs et l'agent de transfection sont tous deux dilués dans du milieu Opti-MEM. Le milieu de transfection est remplacé par du milieu complet après 5 à 6 heures.

Les cellules sont transfectées une seconde fois 48h après la première transfection et dans les mêmes conditions. 48 heures après la seconde transfection, les cellules reçoivent les différents traitements pendant une nuit puis sont analysées par cytométrie en flux et les surnageants sont conservés à -80°C pour les analyses par tests ELISA.

2.10. Transfections par électroporation

Les transfections par électroporation sont réalisées en utilisant un appareil d'électroporation Nucleofector (AMAXA biosystems). La veille des transfections, les cellules sontensemencées au tiers de la surface de culture de façon à ce qu'elles soient à environ 90% de confluence lors de la transfection. On suit ensuite les recommandations du fabricant en utilisant un kit de transfection contenant un tampon optimisé pour les cellules endothéliales (HUVEC Nucleofector kit). On transfecte généralement 1 million de cellules par essai.

L'efficacité de la transfection est évaluée en analysant un témoin positif (transfection d'un vecteur codant simplement une protéine GFP) 48 à 72 heures après par cytométrie en flux.

Les vecteurs utilisés pour transférer les protéines d'enveloppe du MSRV (Env-ms) ou la syncytine (HERV-W E1) sont des plasmides commerciaux pEGFP C3 contenant un insert comprenant la séquence complète des protéines rétrovirales, placées sous le contrôle d'un promoteur fort pCMV. Les vecteurs contiennent aussi le gène Neo^r permettant une sélection par un antibiotique (G 418).

Chapitre 3 : Résultats

3.1. Effets inflammatoires des enveloppes rétrovirales

Les résultats présentés dans cette section ont pour but principal d'analyser les propriétés pro-inflammatoires de l'enveloppe du MSR/V sur l'endothélium vasculaire cérébral *in vitro*. Pour cela une analyse a d'abord été effectuée en prenant pour modèle les cellules HCMEC/D3. Par la suite, des expériences complémentaires ont été effectuées sur un autre modèle classique d'endothélium, les cellules HUVEC.

3.1.1. Effets des protéines recombinantes sur le modèle HCMEC/D3

Les propriétés pro-inflammatoires de Env-ms ont précédemment été démontrées par notre groupe de recherche sur des cellules immunitaires. Dans cette première partie de l'étude, nous sommes attachés à étudier la réponse pro-inflammatoire des cellules HCMEC/D3 de manière à reproduire sur ce modèle les résultats précédents concernant la dose dépendance de la réponse à l'enveloppe recombinante du MSR/V en mesurant certains paramètres pertinents relatifs à l'inflammation de l'endothélium vasculaire. Les expériences présentées dans cette première partie visaient également à démontrer la spécificité d'action de l'enveloppe recombinante. Enfin, les premières expériences ont pour but d'analyser le comportement du modèle HCMEC/D3 dans nos conditions de culture.

3.1.1.1. Caractéristiques générales du modèle HCMEC/D3

La première étape a été la vérification de la capacité des cellules HCMEC/D3 à former des monocouches de cellules jointives et à exprimer certaines protéines impliquées dans la formation de ces jonctions.

La figure 3.1 montre que les cellules HCMEC/D3 forment bien une monocouche adhérente dans les conditions de culture utilisées dans cette étude (Fig. 3.1 A). De plus les cellules

expriment plusieurs protéines impliquées dans la formation, le maintien et la régulation de la perméabilité des jonctions cellule-cellule. En effet, on observe la présence de PECAM-1 (Fig 3.1 B) et de la VE-cadhérine (Fig 3.1 C) au niveau des jonctions cellule-cellule de la monocouche de HCMEC/D3. En revanche on peut observer sur les figure 3.1 D et E que les protéines impliquées dans la formation des jonctions serrées ZO-1 et claudine-3 respectivement ne se retrouvent pas distribuées correctement au niveau des jonctions mais plutôt de manière intra-cytoplasmique. Ce point sera discuté dans le chapitre 3.

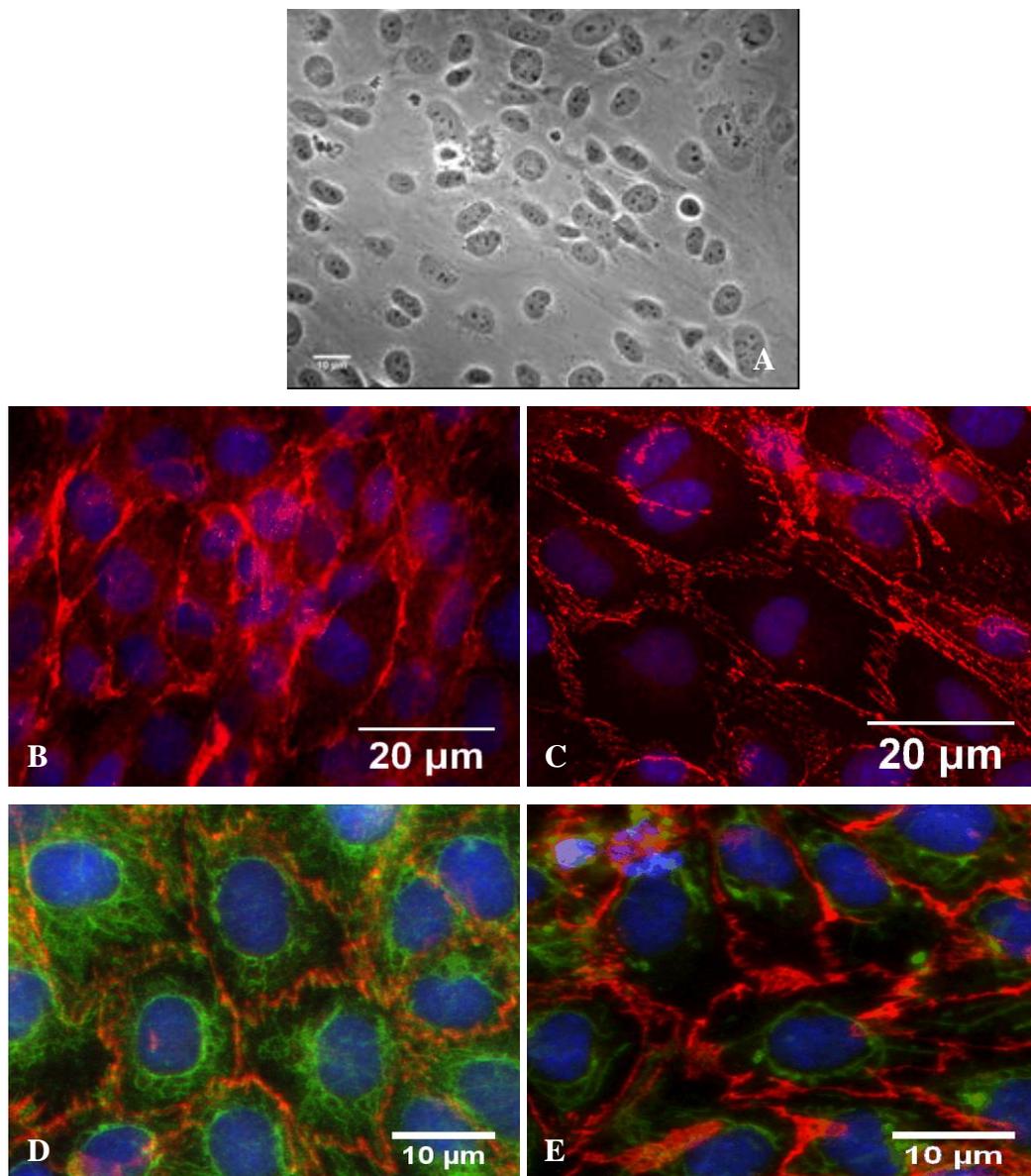


Figure 3.1. Cellules HCMEC/D3 confluentes observées après fixation et perméabilisation. A. Contraste de phase. B. Marquage de PECAM-1 (rouge) et noyaux (bleu). C. Marquage VE-cadhérine (rouge) et noyaux (bleu). D. Marquage ZO-1 (vert), VE-cadhérine (rouge) et noyaux (bleu). D. Marquage claudine-3 (vert), VE-cadhérine (rouge) et noyaux (bleu).

La réponse des cellules à des stimuli pro-inflammatoires a ensuite été testée. Pour cela, les cellules HCMEC/D3 ont été traitées pendant une nuit avec du TNF- α à 100U/ml. L'expression d'ICAM-1 a été analysée par plusieurs techniques différentes. Les figures 3.2 A et 3.2 B montrent comment a été faite l'analyse de l'expression d'ICAM-1 par cytométrie en flux.

La figure 3.2 A montre une représentation en nuage de points des événements analysés. Cette représentation permet de définir la fenêtre d'analyse R1 sur la base des paramètres de taille et de granulosité et ainsi d'isoler les cellules vivantes des débris pour la suite de l'analyse. Les histogrammes présentés sur la figure 3.2 B montrent la répartition des populations analysées en fonction de l'intensité de fluorescence mesurée et permettent de calculer la valeur moyenne de fluorescence pour chaque population (MFI : Mean Fluorescence intensity) Cette technique de marquage et d'analyse a par la suite été réutilisée pour toutes les autres expériences où l'expression d'ICAM-1 a été mesurée et seules les valeurs caractéristiques basées sur les intensités de fluorescence seront présentées et discutées dans la suite des résultats présentés dans cette étude.

Par ailleurs, les figures 3.2 B, C et D montrent que les cellules HCMEC/D3 sont capables de surexprimer fortement ICAM-1 en réponse au traitement par le TNF- α . De ce fait ICAM-1 a été utilisé dans la suite des analyses en tant que témoin principal d'inflammation du modèle HCMEC/D3 du fait de la reproductibilité des expériences de stimulation et de la facilité à le mesurer par cytométrie en flux. On notera enfin que des expériences de marquage ont également été réalisées avec d'autres marqueurs d'inflammation de l'endothélium comme VCAM-1 ou ALCAM (récemment montré comme ayant un rôle dans la migration trans-endothéliale des leucocytes [115]) mais n'ont pas donné de résultats concluants, ces deux marqueurs n'ont donc pas été retenus pour la suite de l'étude.

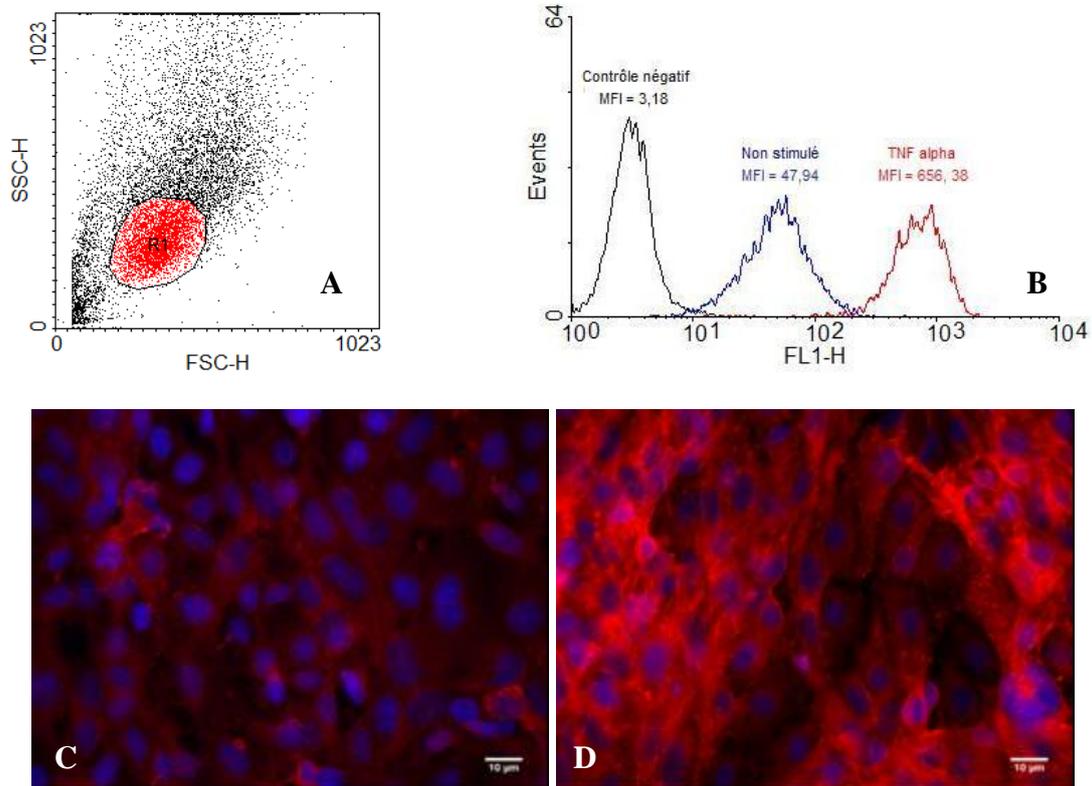


Figure 3.2. Analyse de l'expression d'ICAM-1 par marquages indirects par les HCMEC/D3 en réponse au traitement sur une nuit au TNF- α à 100U/ml. A. représentation en nuage de point des cellules selon leur taille (FSC) et leur granulosité (SSC). La fenêtre notée R1 correspond à la population de cellules analysée pour les mesures d'intensité de fluorescence. B. Histogramme des intensités de fluorescence sur les cellules de la région R1. Le contrôle négatif est réalisé avec l'anticorps secondaire seul. MFI : Mean Fluorescence Intensity. C et D. Images de microscopie à fluorescence après marquage d'ICAM-1 (rouge) et des noyaux (bleu) sur des cellules non stimulées (C) ou stimulées au TNF- α (D). Les images sont prises avec un temps d'exposition identique (500ms) pour que les intensités de fluorescence restent comparables.

3.1.1.2. Analyse de l'expression d'ICAM-1 en réponse aux enveloppes rétrovirales

Le premier paramètre inflammatoire mesuré sur les HCMEC/D3 suite à un traitement par les enveloppes recombinantes a donc été l'expression d'ICAM-1. Pour cela les cellules HCMEC/D3 confluentes ont été traitées pendant une nuit avec l'enveloppe recombinante soluble du MSR_V (Env-ms) et avec la syncytine (Env-syn) à des concentrations allant de 0,5µg/ml à 2µg/ml ainsi qu'avec du TNF-α qui sert de témoin positif.

Les résultats présentés sur la figure 3.3 montrent que l'enveloppe du MSR_V induit une forte augmentation dose dépendante de l'expression d'ICAM-1 sur les cellules HCMEC/D3. Le traitement par Env-ms induit en effet une expression d'ICAM-1 environs 3 fois plus importante qu'en conditions basales pour la plus faible concentration et jusqu'à 7 fois plus importante pour la plus forte concentration. Le traitement des cellules avec 2µg/ml d'enveloppe recombinante aboutit une surexpression comparable à celle induite par 100U/ml de TNF-α (soit 5pg/ml), preuve d'un effet fortement pro-inflammatoire. Les mêmes effets sont observés lorsque l'expression d'ICAM-1 est analysée en microscopie de fluorescence (Fig 3.3 B). De plus, cet effet est spécifique de l'enveloppe du MSR_V car le traitement dans les mêmes conditions par la syncytine induit une surexpression d'ICAM-1 négligeable pour les deux plus faibles concentrations et très faible pour la plus forte concentration par comparaison avec Env-ms à la même dose.

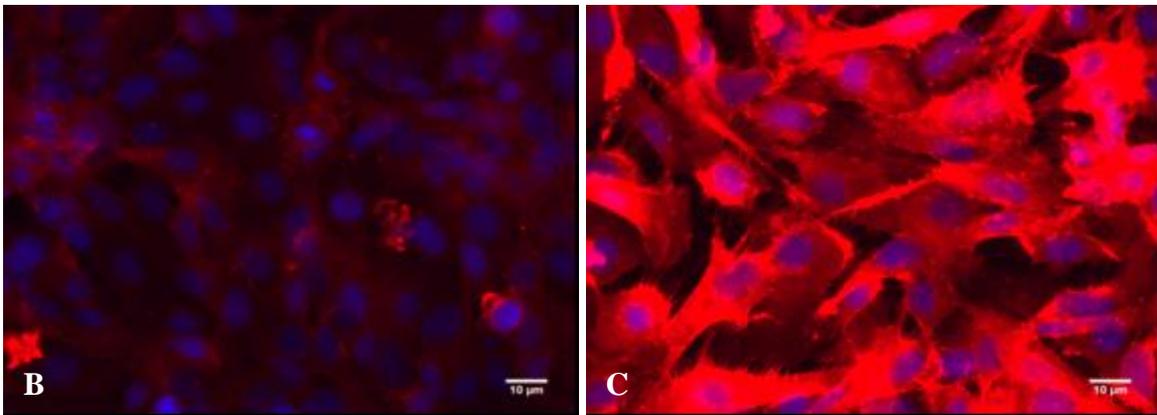
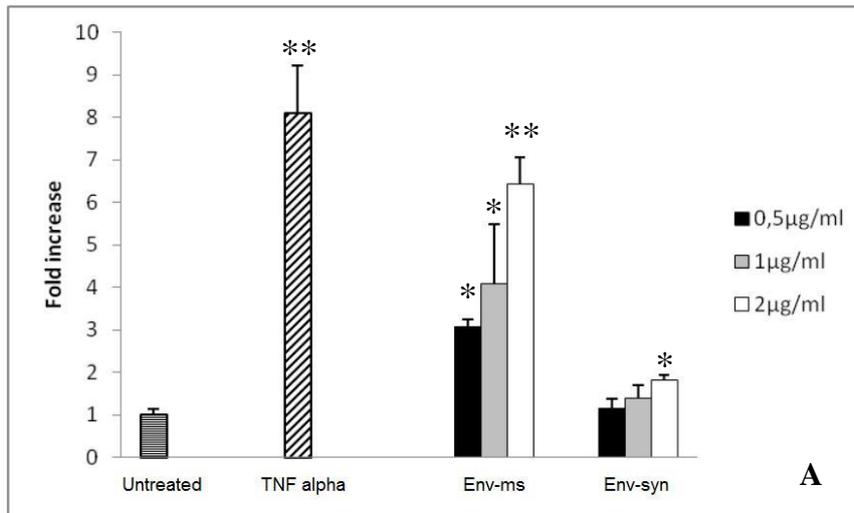


Figure 3.3. Analyse de l'expression d'ICAM-1 par les HCMEC/D3 en réponse à Env-ms et à Env-syn. Les cellules sont traitées une nuit par les protéines recombinantes à différentes concentration ou par du TNF- α à 100U/ml. A. Analyse par cytométrie en flux après marquage indirect. B, C. Analyse par microscopie à fluorescence sur des cellules non traitées (B) et traitées par Env-ms à 2µg/ml (C). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ par rapport au non traité.

3.1.1.3. Tests fonctionnels : Effets de Env-ms sur les phénomènes d'adhésion

Le fait que la protéine Env-ms induise au niveau moléculaire une surexpression d'ICAM-1 par les cellules endothéliales amène à penser qu'elle doit également avoir un effet au niveau fonctionnel sur l'adhésion de cellules immunitaires à la monocouche de cellules endothéliales.

Pour vérifier cette hypothèse, des tests fonctionnels ont été réalisés en utilisant des cellules de la lignée HL-60. Ces cellules sont des progéniteurs myélocytaires initialement isolés chez une patiente atteinte de leucémie. Elles ont la capacité de se différencier en différents types cellulaires comme des granulocytes neutrophiles, éosinophiles ou plutôt vers une voie de type macrophages en fonction des stimuli qu'elles reçoivent. Dans les tests présentés ici, les cellules HL-60 ont été activées de manière à ce qu'elles se différencient en monocytes (précurseurs des macrophages) puis laissées à adhérer sur une monocouche de cellules HCMEC/D3 ayant reçu au préalable un traitement par Env-ms ou par du LPS qui sert ici de témoin positif.

Les résultats présentés sur la figure 3.4 montrent que l'adhésion des cellules HL-60 à la monocouche de cellules HCMEC/D3 est multipliée par plus de 2 suite au traitement des cellules endothéliales par Env-ms à 2µg/ml. Cette augmentation est plus importante que celle induite par le témoin positif LPS à 100ng/ml. Ces résultats montrent que l'effet de Env-ms observé au niveau moléculaire se traduit bien par un effet au niveau fonctionnel.

Cependant, l'objectif initial de ces analyses fonctionnelles était de parvenir à développer un test permettant de mesurer la migration trans-endothéliale des cellules HL-60 à travers une monocouche de cellules HCMEC/D3 cultivées sur une membrane perméable (chambre de Boyden). Ce type de test n'a jamais donné de résultats satisfaisant probablement à cause d'une mauvaise formation des jonctions serrées dans nos conditions de culture. Ce point sera discuté dans le chapitre 3.

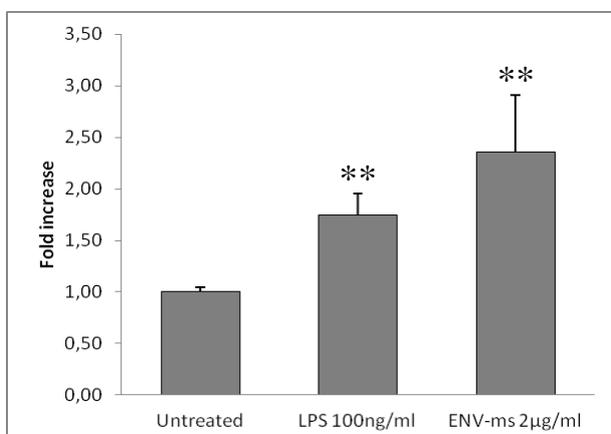


Figure 3.4. Test d'adhésion HCMEC/D3-HL-60. Les cellules HL-60 induites et marquées sont laissées 35 min à adhérer sur une monocouche de cellules endothéliales stimulées ou non. La mesure finale se fait par lecture de fluorescence après lyse des cellules adhérentes. ** $p \leq 0,01$

3.1.1.4. Analyse de la production de cytokines en réponse aux enveloppes rétrovirales

Le fait qu'ICAM-1 soit surexprimé suite au traitement par l'enveloppe du MSRVR amène à penser que cette protéine induit probablement d'autres types de réponses inflammatoires au niveau des cellules endothéliales.

La présence de plusieurs cytokines pro-inflammatoire a donc été mesurée dans les surnageants de cultures de cellules HCMEC/D3 par des tests de type ELISA sandwich. Pour cela, les cellules ont été traitées comme précédemment par les deux enveloppes recombinantes puis les surnageants sont récupérés après une nuit de stimulation puis analysés.

La première cytokine analysée est l'IL-6. C'est un témoin classique d'inflammation. La figure 3.5 montre clairement que l'enveloppe du MSRVR induit une forte production d'IL-6 et de manière dose dépendante. De manière intéressante, la production d'IL-6 en réponse à Env-ms dépasse celle induite par 100U/ml de TNF- α dès 1 μ g/ml de protéine recombinante. Enfin, de la même manière que ce qui a été observé sur ICAM-1, la syncytine recombinante n'a pas d'effet significatif sur la production d'IL-6 quelle que soit la concentration utilisée.

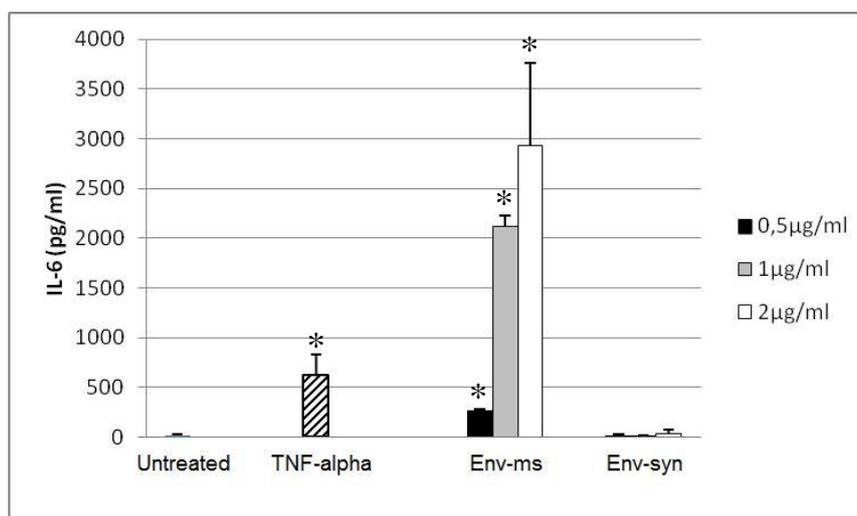


Figure 3.5. Analyse par ELISA de la production d'IL-6 par les HCMEC/D3 après traitement par les enveloppes recombinantes sur une nuit. Le TNF- α est introduit à 100U/ml et sert de témoin positif. * $p \leq 0,05$

La production d'IL-8, une autre cytokine majeure jouant un rôle dans les phénomènes d'inflammation a ensuite été analysée. Les résultats obtenus sont similaires à ceux observés pour l'IL-6. En effet, on observe sur la figure 3.6 une forte production dose dépendante d'IL-8 en réponse à des doses croissantes de l'enveloppe du MSRV mais pas de production significative en réponse à la syncytine quelle que soit la dose. En revanche les quantités produites en réponse à Env-ms ne dépassent jamais celle induite par le TNF- α à 100U/ml.

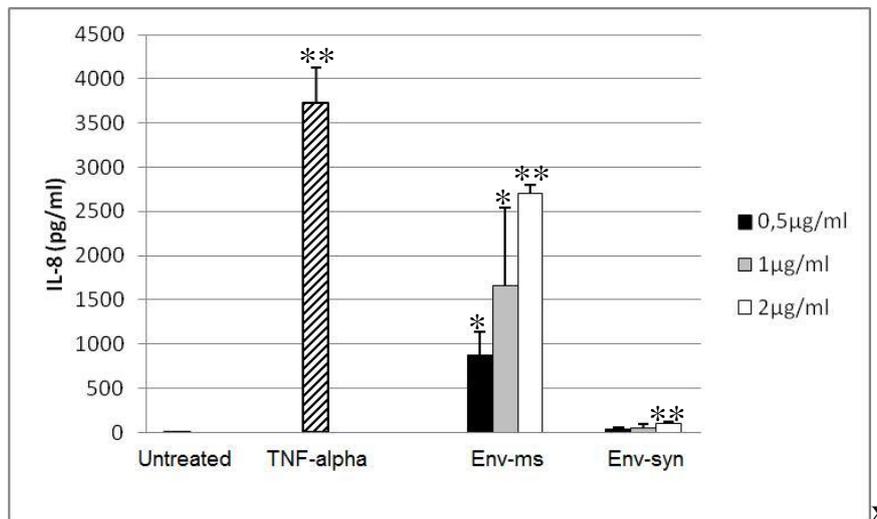


Figure 3.6. Analyse par ELISA de la production d'IL-8 par les HCMEC/D3 après traitement par les enveloppes recombinantes sur une nuit. Le TNF- α est introduit à 100U/ml et sert de témoin positif. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$

Enfin, une dernière cytokine majeure des processus inflammatoires a été analysée, le TNF- α . Les résultats présentés sur la figure 3.7 montrent cette fois que le traitement des HCMEC/D3 par les enveloppes recombinantes induit une faible production de TNF- α quelle que soit la dose utilisée mais pas de manière dose dépendante. Toutes les valeurs exceptée celle du témoin positif sont proches voir en dessous des limites de détection du kit utilisé. Les résultats suggèrent que les HCMEC/D3 ne sont capables de produire cette cytokine qu'en quantité très limitée puisque les valeurs mesurées avec le contrôle positif sont loin de celles obtenues lorsque l'on analyse la production d'autres cytokines.

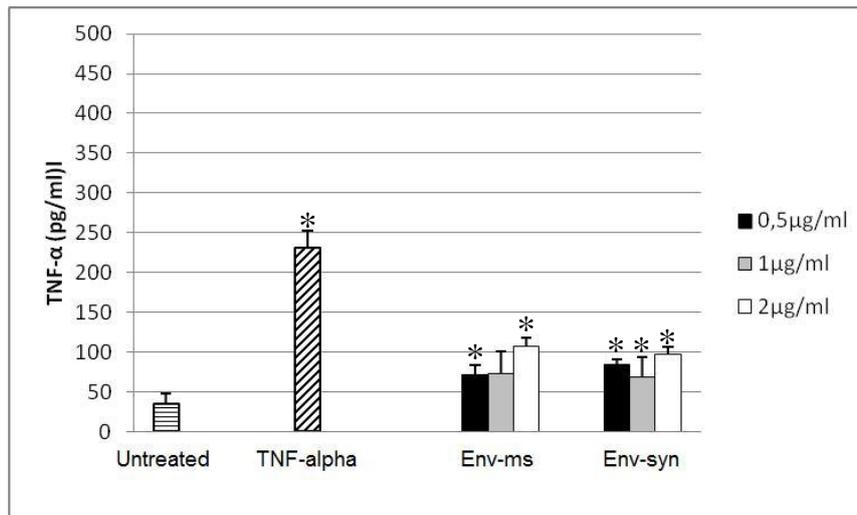


Figure 3.7. Analyse par ELISA de la production de TNF- α par les HCMEC/D3 après traitement par les enveloppes recombinantes sur une nuit. Le TNF- α qui sert de témoin positif est introduit à 100U/ml ce qui correspond à 5pg/ml soit moins que le seuil de détection du test ce qui ne peut donc pas s'additionner à la quantité de TNF- α mesurée à l'issue de la stimulation. * $p \leq 0,05$

3.1.1.5. Spécificité d'action de l'enveloppe du MSRVR sur les HCMEC/D3

Après avoir montré clairement que l'enveloppe du MSRVR mais pas la syncytine exerçait un effet pro inflammatoire sur les cellules HCMEC/D3 à la fois au niveau moléculaire et fonctionnel, l'étape suivante fut d'essayer de reproduire les expériences d'inhibition par des anticorps neutralisants qui ont été faites lors des études précédentes de notre groupe de recherche. Pour cela, nous disposons de plusieurs anticorps monoclonaux précédemment développés, capables de reconnaître et d'inhiber les effets pro-inflammatoires induits par l'enveloppe du MSRVR sur les cellules cibles.

Lors de ces expériences de neutralisation, seule la protéine d'enveloppe recombinante du MSRVR a été testée puisque la syncytine n'a pas démontré d'effets pro-inflammatoires sur les HCMEC/D3. Les expériences ont consisté à incuber au préalable la protéine d'enveloppe avec différents anticorps monoclonaux dirigés contre elle puis à effectuer une stimulation des

cellules endothéliales avec le mélange anticorps-protéine pendant une nuit avant d'analyser la réponse ICAM-1 des cellules par cytométrie en flux.

Les résultats présentés sur la figure 3.8 montrent les résultats obtenus avec les clones 3B2H4 et 13H5A5 mais d'autres ont été testés sans qu'il y ait d'effets significatifs. L'analyse montre que l'enveloppe du MSR.V seule induit bien une surexpression d'ICAM-1 et que cette surexpression est moins importante lorsque la protéine a été traitée avec l'un ou l'autre des deux anticorps. Lorsqu'on quantifie cette diminution de l'effet induit, après avoir soustrait la valeur de l'expression basale d'ICAM-1, on obtient des pourcentages d'inhibition d'environ 50% pour chacun des deux anticorps. Par ailleurs l'utilisation d'un anticorps contrôle qui ne reconnaît pas l'enveloppe (anticorps anti-gag) n'induit pas d'effet significatif.

De la même façon, lorsqu'on analyse la production d'IL-6 en réponse à Env-ms prétraitée ou non par les anticorps neutralisants, on observe que le prétraitement inhibe plus de 50% de l'effet induit par Env-ms non prétraitée sur la production d'IL-6 par les cellules HCMEC/D3.

Ces résultats montrent qu'il est possible d'inhiber en partie l'effet induit par Env-ms sur l'expression d'ICAM-1 ainsi que sur la production de cytokines pro-inflammatoires et que cet effet est donc bien spécifique de la protéine utilisée. On notera enfin que le fait de mélanger les deux anticorps n'augmente pas l'inhibition observée.

La protéine d'enveloppe recombinante Env-ms qui a jusqu'ici montré un effet pro-inflammatoire sur le modèle HCMEC est produite grâce à un système utilisant des bactéries *Escherichia coli*. De ce fait il y a un risque pour que l'effet observé provienne d'une contamination par des endotoxines bactériennes, c'est-à-dire du LPS. Pour appuyer le fait que l'effet observé est bien imputable à la protéine recombinante et non pas à une contamination par une endotoxine, nous avons réalisé un contrôle supplémentaire en effectuant un test d'inhibition à la polymyxine B. La polymyxine B (PB) est un composé chimique ayant la faculté de se lier au LPS et de neutraliser son action en l'empêchant d'interagir avec son récepteur (classiquement le récepteur TLR4).

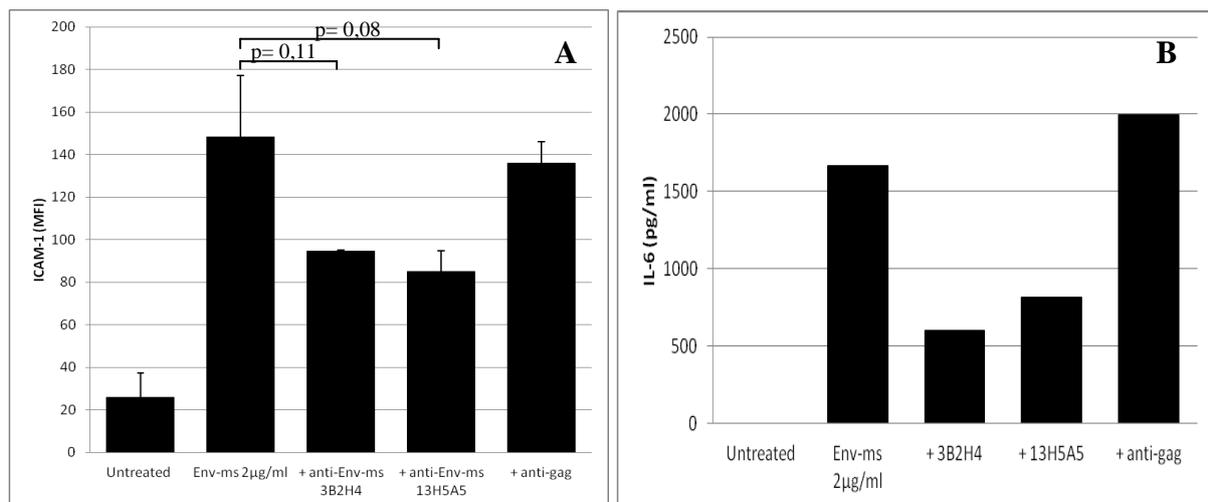


Figure 3.8. Tests d'inhibition par des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine d'enveloppe. A. Analyse par cytométrie en flux de l'expression d'ICAM-1 en réponse au traitement par l'enveloppe du MSRV à 2µg/ml pendant une nuit seule ou préalablement incubée avec les anticorps neutralisants 3B2H4 et 13H5A5 ou avec un anticorps irrelevant anti-gag. Les résultats représentent les moyennes MFI de 2 expériences indépendantes. B. Analyse de la production d'IL-6 par ELISA. Mêmes conditions de stimulation que (A).

Dans l'expérience présentée sur la figure 3.9, la protéine Env-ms et du LPS ont été traités par de la polymyxine B puis incubés pendant une nuit avec les cellules HCMEC/D3 avant d'analyser l'expression d'ICAM-1. Les résultats montrent que le traitement du LPS avec la polymyxine inhibe quasiment totalement la surexpression d'ICAM-1 induite par du LPS non traité. En revanche le traitement de la protéine Env-ms de la même manière n'inhibe pas son action pro-inflammatoire par comparaison à l'effet de la protéine non traitée. Ces observations montrent que l'effet observé en réponse à Env-ms ne peut pas être du à une contamination du lot d'enveloppe recombinante utilisé depuis le début de l'étude par du LPS.

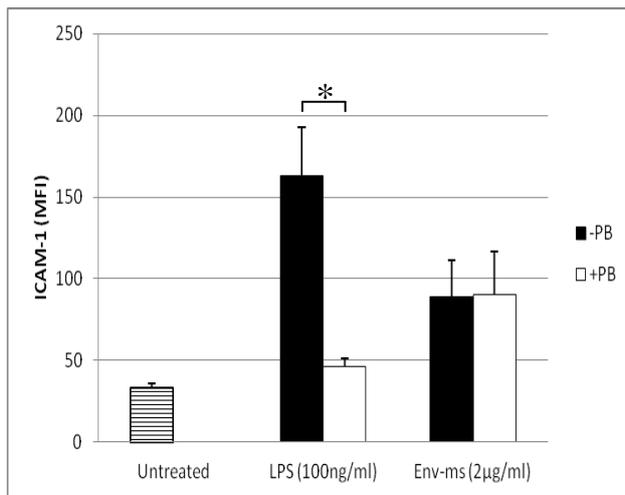


Figure 3.9. Test d'inhibition à la polymyxine B. Le LPS et Env-ms sont pré-incubés ou non pendant 30 minutes avec de la polymyxine B (25µg/ml) avant d'être mis en présence des cellules HCMEC/D3 pour la nuit. L'expression d'ICAM-1 est ensuite analysée par cytométrie en flux. Les valeurs MFI proviennent de 2 expériences indépendantes. $p \leq 0,05$

3.1.2. Effet des protéines d'enveloppe transfectées sur le modèle HCMEC/D3

Les protéines d'enveloppe étudiées proviennent de rétrovirus endogènes, il serait donc intéressant de connaître l'effet des enveloppes rétrovirales lorsqu'elles sont exprimées de manière endogène par les cellules. Etant donné que notre groupe de recherche avait précédemment développé des vecteurs codant pour l'enveloppe complète du MSR/V et pour la syncytine, des expériences de transfection par électroporation visant à faire exprimer les enveloppes dans le modèle HCMEC/D3 ont été réalisées.

Les images présentées sur la figure 3.10 montrent que 48h après transfection, la morphologie des cellules ayant reçu le vecteur codant l'enveloppe du MSR/V n'est pas affectée et les cellules ont donc été placées en milieu de sélection. En revanche, celles qui ont reçu le vecteur codant la syncytine présentent des caractéristiques particulières puisqu'on observe des cellules plurinucléées. Ce phénomène est dû à la fusion des membranes des cellules exprimant la syncytine avec celles des cellules adjacentes et se produit normalement à un stade précoce de la formation du placenta. Ces résultats montrent que malgré la forte homologie de séquence entre la syncytine et l'enveloppe du MSR/V, l'expression de ces 2 protéines par des cellules ne les exprimant pas en temps normal mène à des phénotypes bien différents.

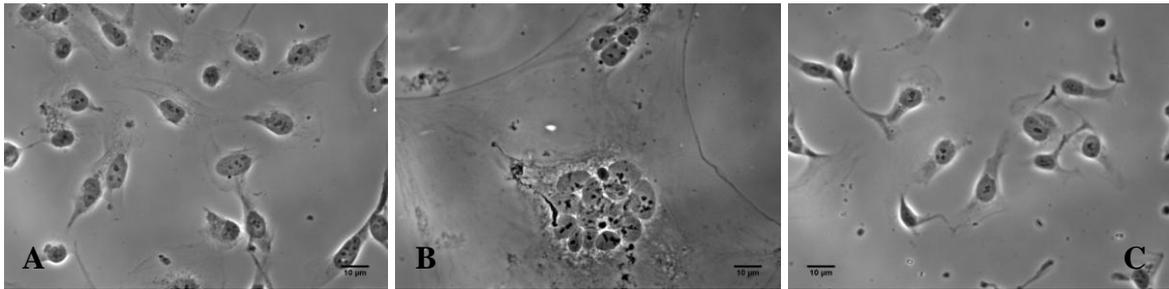


Figure 3.10. Cellules HCMEC/D3 observées en contraste de phase 48 heures après transfection. A. Cellules non transfectées. B. Cellules transfectées par un vecteur codant la syncytine. C. Cellules transfectées par un vecteur codant l'enveloppe complète du MSRV.

Puisque les cellules transfectées par l'enveloppe du MSRV sont morphologiquement indifférenciables des cellules normales, des immunomarquages ont ensuite été réalisés en utilisant les mêmes anticorps que ceux précédemment utilisés pour les expériences de neutralisation, pour savoir si l'enveloppe du MSRV était bien exprimée par les cellules transfectées. Ces anticorps ont donc permis de révéler l'expression et la localisation de l'enveloppe du MSRV dans les cellules transfectées par microscopie à fluorescence.

Les images présentées sur la figure 3.11 ont été obtenues sur des cellules endothéliales transfectées par l'enveloppe du MSRV et cultivées pendant 27 jours en milieu de sélection. On peut observer que l'enveloppe n'est pas exprimée par toutes les cellules qui ont pourtant toutes intégré le gène de sélection. La localisation de l'enveloppe est plutôt périnucléaire et plus diffuse dans le cytoplasme. Cependant, on n'observe pas son expression au niveau membranaire contrairement à ce à quoi l'on pouvait s'attendre. Il faut également noter que des essais d'immunomarquages ont été effectués avec différents anticorps et que seul un marquage indirect avec le clone 13H5A5 donne des intensités satisfaisantes. En effet, des marquages indirects avec le clone 3B2H4 ou directs avec le clone 13H5A5 couplé au FITC montrent également une localisation périnucléaire et cytoplasmique de l'enveloppe mais avec des intensités à peine supérieures à du bruit de fond. Il y a donc de fortes différences d'affinité suivant l'anticorps utilisé.

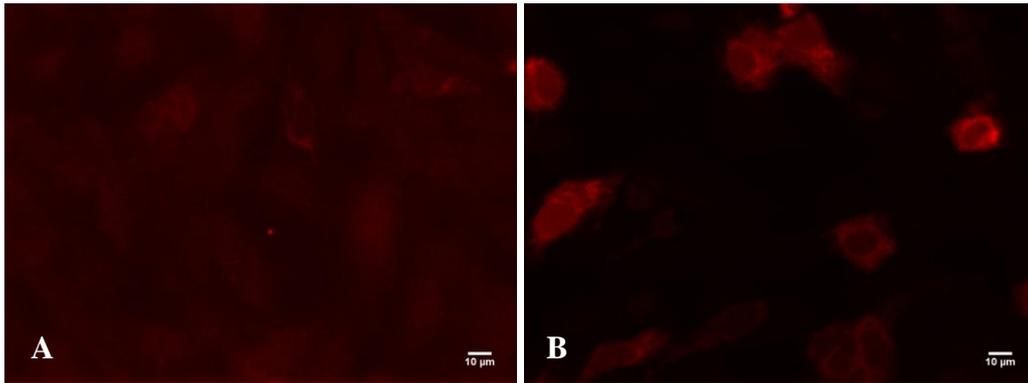


Figure 3.11. Cellules HCMEC/D3 fixées et perméabilisées observées en microscopie à fluorescence après marquage indirect avec l'anticorps primaire clone 13H5A5. A. Cellules non transfectées. B. Cellules transfectées par le vecteur codant l'enveloppe complète du MSR, 27 jours après transfection.

Enfin, ces observations ont été vérifiées par cytométrie en flux. En effet, les essais d'immunomarquages sur des cellules vivantes et non perméabilisées présentés sur la figure 3.12 montrent que l'on ne détecte pas d'expression de l'enveloppe quelque soit l'anticorps utilisé pour la marquer puisque les valeurs de fluorescence sont comparables à celles obtenues pour le contrôle isotypique. La figure 3.12 montre également que le fait de transférer l'enveloppe du MSR dans les HCMEC/D3 ne semble pas avoir d'effet sur l'expression d'ICAM-1 par les cellules endothéliales puisqu'on n'observe pas de différences significatives entre des cellules transfectées et des cellules non transfectées.

Cette partie de l'étude montre donc que l'expression endogène de l'enveloppe du MSR par les cellules endothéliales HCMEC/D3 ne semble pas déclencher de modifications ni au niveau morphologique ni au niveau de l'inflammation contrairement à la syncytine qui va induire la fusion des membranes lorsqu'elle est exprimée par des cellules transfectées

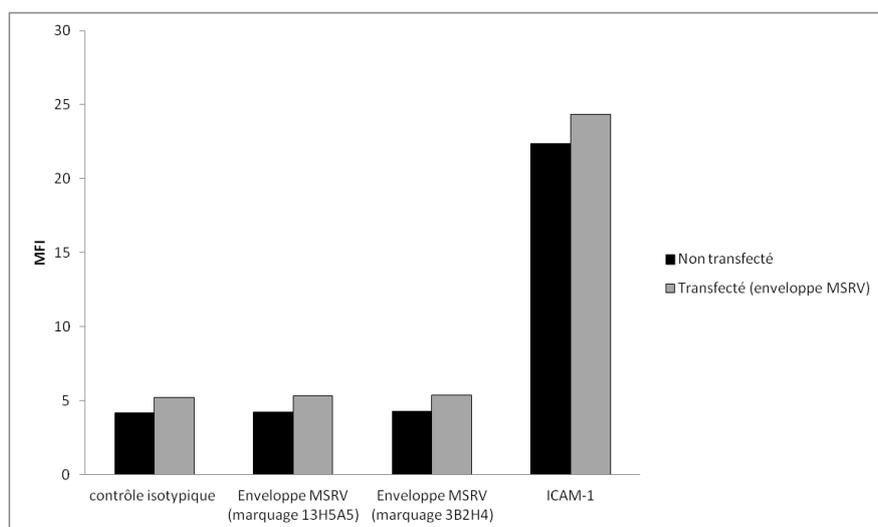


Figure 3.12. Expression de l'enveloppe du MSRV (anticorps primaire ayant servi à l'analyse en cytométrie indiqué entre parenthèses) et ICAM-1 par des cellules vivantes non perméabilisées et non transfectées ou 20 jours après transfection par le vecteur codant pour l'enveloppe. Le contrôle isotypique est réalisé avec un anticorps primaire anti-CD3, une protéine qui n'est pas présente à la surface des cellules endothéliales.

3.1.2. Effets des protéines recombinantes Env-ms et Env-syn sur le modèle HUVEC

Afin d'étudier le comportement d'un autre type d'endothélium en réponse aux protéines d'enveloppe recombinantes et également afin de valider les résultats obtenus sur le modèle HCMEC/D3, certaines des analyses décrites dans la section 3.1.1 ont été reproduites sur des cultures primaires de cellules endothéliales HUVEC. Ces cellules représentent le modèle classique d'endothélium humain pour les études en laboratoire et se comportent de la même façon que les HCMEC/D3 en culture, en formant des monocouches adhérentes. Dans cette section, la réponse inflammatoire du modèle HUVEC aux protéines d'enveloppes recombinantes sera analysée au niveau de l'expression d'ICAM-1 et de l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires.

3.1.2.1. Analyse de l'expression d'ICAM-1 en réponse aux enveloppes rétrovirales

De la même manière que pour les HCMEC/D3, les cellules HUVEC ont dans un premier temps été traitées par la protéine Env-ms à des concentrations croissantes et par la syncytine recombinante seulement à la plus forte concentration (2µg/ml) puisque nous nous attendions à ce que son effet soit négligeable par rapport à celui de Env-ms.

Les résultats présentés sur la figure 3.13 montrent l'analyse de l'expression d'ICAM-1 en réponse aux différents traitements. On peut y observer que Env-ms induit sur les HUVEC une surexpression dose dépendante de l'expression d'ICAM-1, dans des proportions similaires à celles observés sur le modèle HCMEC/D3. A 1µg/ml et 2µg/ml, la stimulation dépasse celle induite par le contrôle positif avec du TNF-α à 100U/ml. Enfin la syncytine recombinante à la plus forte dose induit un effet bien plus faible que Env-ms dans les mêmes proportions que sur le modèle HCMEC/D3.

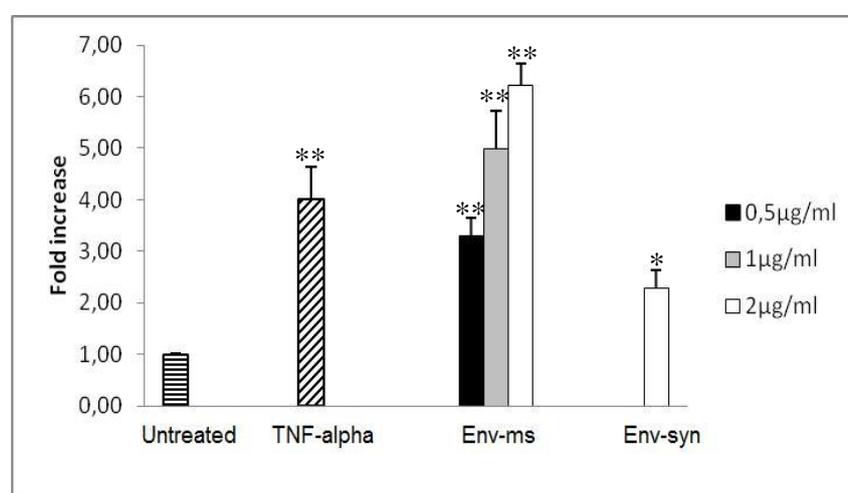


Figure 3.13. Analyse par cytométrie en flux après marquage indirect d'ICAM-1 sur les HUVEC en réponse à Env-ms et à Env-syn. Les cellules sont traitées une nuit par les protéines recombinantes à différentes concentrations ou par du TNF-α à 100U/ml. * $p \leq 0,05$
** $p \leq 0,001$

3.1.2.2. Analyse de la production de cytokines en réponse aux enveloppes rétrovirales

Toujours de la même manière que lors de l'étude du modèle HCMEC/D3, la production de cytokines pro-inflammatoires dans les surnageants de culture des cellules HUVEC a été analysée par ELISA suite aux différents traitements par les protéines recombinantes. Ainsi, la production d'IL-6 et d'IL-8 a été mesurée après une nuit de stimulation.

Les figures 3.14 et 3.15 montrent que les cellules HUVEC ont un profil inflammatoire différent de celui des HCMEC/D3.

En effet on peut observer une forte production dose dépendante d'IL-8 en réponse à Env-ms qui dépasse celle induite par le témoin positif (TNF- α) dès 1 μ g/ml. On observe également que la syncytine a un effet beaucoup moins marqué que Env-ms mais cependant plus important que celui observé sur le modèles HCMEC/D3. Toujours par comparaison au modèle précédent, il faut noter que les quantités d'IL-8 produites par les cellules HUVEC sont plus importantes que celles produites par les HCMEC/D3 (jusqu'à 8000 pg/ml pour les HUVEC après traitement par l'enveloppe du MSRV à 2 μ g/ml contre 2500 pg/ml pour les HCMEC/D3 dans les mêmes conditions).

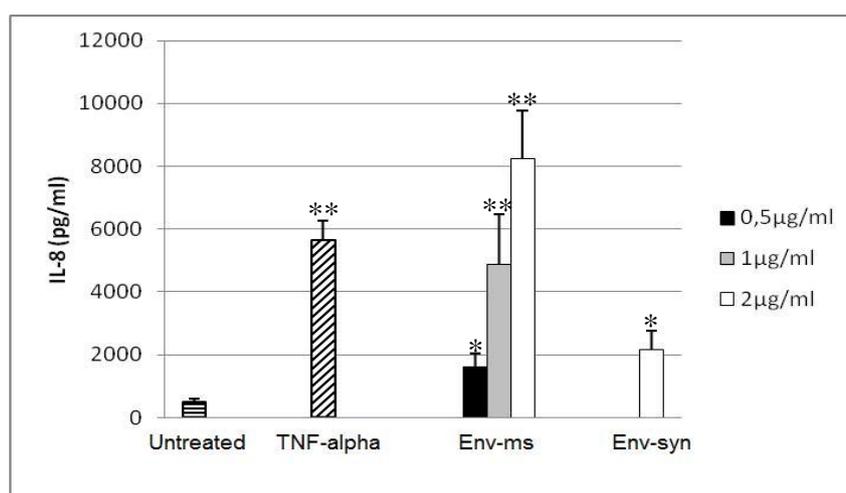


Figure 3.14. Analyse par ELISA de la production d'IL-8 par les HUVEC après traitement par les enveloppes recombinantes sur une nuit. Le TNF- α est introduit à 100U/ml et sert de témoin positif. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,001$

En revanche lorsqu'on observe la production d'IL-6 on s'aperçoit que les quantités produites sont très faibles comparées à celles d'IL-8 et comparées aux résultats obtenus sur le modèle HCMEC/D3. Aucune production significative par rapport au témoin non traité n'est observée, quelle soit la dose d'enveloppe recombinante utilisée (l'échelle de la figure a été choisie volontairement pour pouvoir comparer la production d'IL-6 à celle d'IL-8 et aux résultats précédents sur le modèle HCMEC/D3). On remarque aussi que le TNF- α qui servait de contrôle positif n'a pas non plus induit une production significative d'IL-6. Cette observation a déjà été faite dans d'autres études et sera discutée dans le chapitre 4.

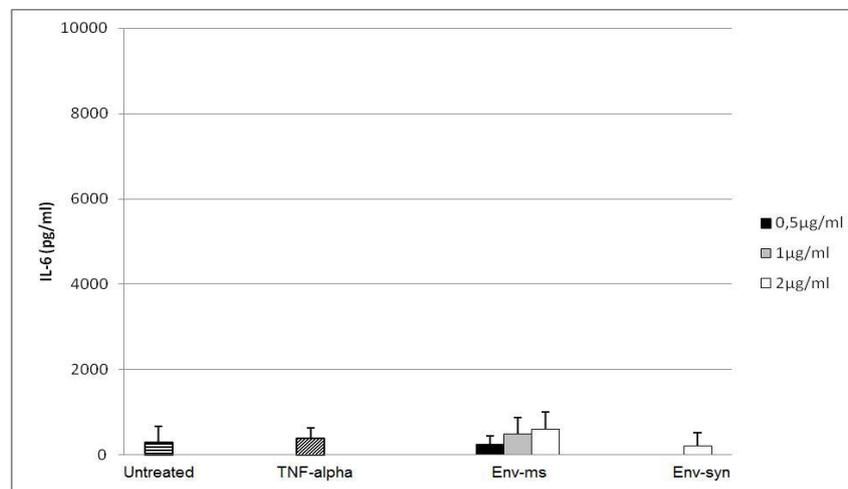


Figure 3.15. Analyse par ELISA de la production d'IL-6 par les HUVEC. Mêmes conditions que pour la figure 3.14.

L'ensemble de ces observations suggèrent que l'enveloppe du MSRNV est également capable d'exercer une action fortement pro-inflammatoire sur ce modèle classique d'endothélium vasculaire même si le profil de la production de cytokines est différent de celui des cellules endothéliales cérébrales.

3.2. Voies de signalisation impliquées dans les mécanismes d'action de l'enveloppe du MSRV

Les études menées précédemment par notre groupe de recherche avaient permis d'identifier le couple de récepteur TLR4/CD14 comme étant celui impliqué dans la reconnaissance de l'enveloppe du MSRV et dans l'activation de certaines cellules immunitaires. Pour démontrer cela, des anticorps neutralisants anti-TLR4 et anti-CD14 avaient été utilisés. Dans l'étude présentée ici, nous avons essayé de démontrer que l'activation des cellules endothéliales par l'enveloppe du MSRV était également dépendante de ce récepteur.

Cependant, l'approche consistant à neutraliser le récepteur par des anticorps monoclonaux n'est pas valide sur les cellules endothéliales utilisées ici. En effet, l'expression de TLR4 n'a jusqu'ici jamais été démontrée à la membrane des cellules endothéliales et il est connu qu'une approche qui utiliserait des anticorps neutralisants ne semble pas permettre d'inhiber ce récepteur sur ce type de cellules [116]. C'est pourquoi une approche de type *Knock down* utilisant des siRNA a été choisie pour étudier le rôle du récepteur TLR4.

Cette section présentera donc dans un premier temps brièvement pourquoi le rôle du corécepteur CD14 n'a pas été investigué plus en détails puis s'attachera à démontrer la présence de TLR4 sur le modèle HCMEC/D3. Enfin, les résultats concernant les *Knock down* de TLR4 seront présentés.

3.2.1. Le rôle du corécepteur CD14

Dans les résultats présentés dans cette section, seul le récepteur TLR4 a été étudié et non son corécepteur CD14, pour plusieurs raisons. Tout d'abord, CD14 n'est pas nécessaire à la réponse impliquant des doses fortes de LPS [97] (l'agoniste classique de du couple TLR4/CD14) de l'ordre de 100ng/ml or en se basant sur les réponses observées dans la première partie de l'étude, on peut considérer que l'enveloppe du MSRV aux concentrations utilisées a un effet comparable à une dose forte de LPS. Par ailleurs, CD14 peut se présenter sous forme soluble dans le sérum ou bien sous forme membranaire à la surface des cellules. Des expériences ont été réalisées afin de détecter la forme membranaire par cytométrie en

flux et en western blot sur des extraits totaux de cellules lysées mais n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de la protéine sur les HCMEC/D3. Concernant la forme soluble, elle peut être présente dans le sérum apporté par les milieux de culture. Mais étant donné que les cellules endothéliales sont assez sensibles à des conditions de culture inappropriées, il est difficile de réaliser des expériences avec une déplétion prolongée en sérum sous peine d'aboutir à des interprétations erronées. Cependant, une expérience de stimulation permettant de comparer la réponse des cellules au LPS en présence ou en absence de sérum a été réalisée.

Les résultats présentés sur la figure 3.16 montrent l'expression d'ICAM-1 sur des cellules HCMEC/D3 non traités ou stimulés une nuit avec du LPS, d'une part en milieu complet et d'autre part dans un milieu sans sérum. Les résultats ne montrent aucune différence significative aussi bien au niveau de l'expression basale d'ICAM-1 qu'au niveau de la surexpression induite par le LPS.

Au final tous ces éléments laissent à penser que CD14 ne serait pas impliqué dans les phénomènes inflammatoires observés dans cette étude, c'est pourquoi les analyses présentées dans les sections suivantes se sont concentrées exclusivement sur le récepteur TLR4.

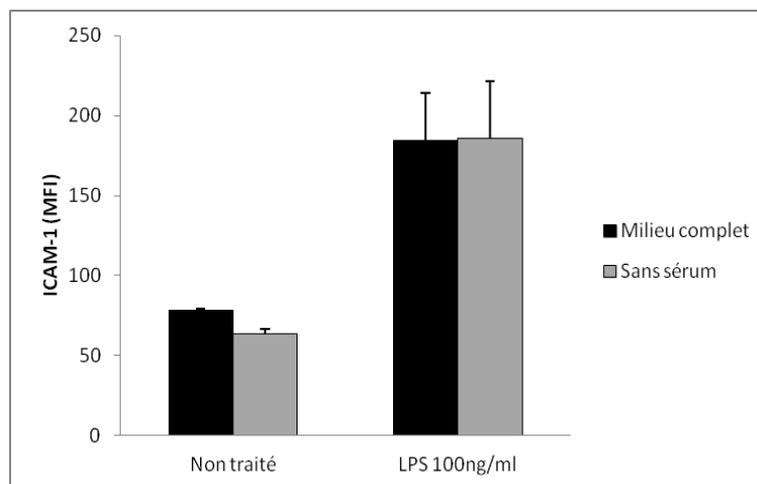


Figure 3.16. Analyse de l'expression d'ICAM-1 sur les HCMEC/D3 en réponse au LPS en conditions normales ou sans sérum. Les cellules sont lavées au PBS avant de changer le milieu de culture par du milieu sans sérum au moment de la stimulation. Les cellules restent une nuit sans sérum, le temps de la stimulation, avant analyse par cytométrie en flux.

3.2.2. Présence du récepteur TLR4 sur les cellules endothéliales

Bien que le récepteur TLR4 n'ait jamais pu être observé à la membrane des cellules endothéliales, plusieurs études ont montré qu'il était bien exprimé par ce type de cellules et des résultats préliminaires de notre groupe de recherche ont également montré que l'ARNm de TLR4 était abondamment présent dans les cellules HCMEC/D3. L'étude a donc été poursuivie avec pour objectif de mettre en évidence le récepteur au niveau protéique sur les cellules HCMEC/D3 principalement mais également sur les HUVEC.

Dans un premier temps des expériences d'immuno-révélation après séparation sur gel d'acrylamide de type Western blot ont été réalisées. Les résultats présentés sur la figure 3.17 montrent plusieurs choses intéressantes.

D'abord, on observe que le récepteur TLR4 est bien présent dans les cellules endothéliales HCMEC/D3 et avec un niveau d'expression similaire dans les cellules HUVEC (Fig. 3.17 A). Cependant, on peut remarquer dans le détail qu'il existe 2 bandes distinctes (Fig. 3.17 B), une bande basse simple et une bande haute qui ressemble à un doublet. Après calcul des poids moléculaires, il apparaît que la bande basse correspond à un poids de 120 kDa et la bande haute à un poids de 150 kDa ce qui ne correspond pas au poids attendu pour TLR4 mais fait plutôt penser à une protéine fortement glycosylée comme proposé dans l'étude d'Ohnishi et al. [98]. Dans cette dernière, c'est la forme lourde donc glycosylée qui est décrite comme active et exprimée à la membrane des cellules.

De plus, on remarque que l'abondance des 2 formes de TLR4 présentes dans les extraits cellulaires varie en fonction du type d'extraction réalisée. En effet, les résultats présentés sur la figure 3.17 A ont été obtenus en utilisant un tampon contenant uniquement du NP40 pour solubiliser les protéines. Cette technique permet de récupérer uniquement les protéines cytoplasmiques et de la membrane externe mais pas celles contenues dans les organites ou dans le noyau. Avec ce type d'extraction on observe uniquement la présence de la bande haute mais quasiment pas la bande basse. En revanche, les résultats présentés sur la figure 3.17 B ont été obtenus en utilisant un tampon d'extraction contenant du NP40 ainsi que du SDS. Dans ce cas, l'extrait obtenu au final contient toutes les protéines de la cellule, aussi bien cytoplasmiques que nucléaires ou bien contenues dans les organites intracellulaires. Avec ce dernier type d'extraction, on observe à la fois la bande basse et la bande haute.

L'ensemble de ces résultats suggère que le récepteur TLR4 est bien présent sur les cellules endothéliales utilisées dans cette étude et qu'il existe deux formes de cette protéine. Une forme immature de bas poids moléculaire qui se trouve dans un organe intracellulaire certainement l'appareil de Golgi. Il doit également exister une forme mature de haut poids moléculaire qui se trouve plus probablement insérée dans des membranes de vésicules cytoplasmiques ou à la membrane externe de manière transitoire.

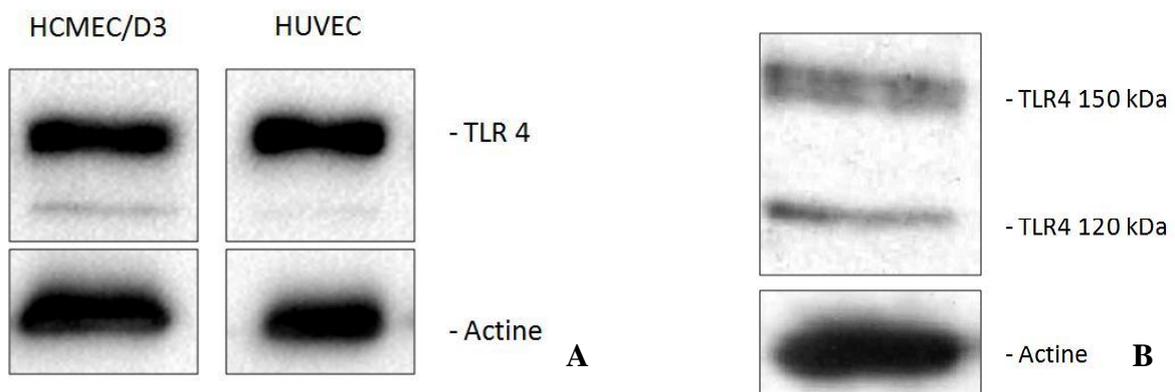


Figure 3.17. Analyse de l'expression du récepteur TLR4 sur les cellules endothéliales par Western blot. A. Les extraits totaux provenant de cellules HCMEC/D3 ou HUVEC confluentes sont obtenus par lyse dans un tampon Tris Hcl contenant uniquement du NP40 pour solubiliser les protéines. Les extraits sont ensuite soumis à un SDS-PAGE puis électrotransfert avant immunorévélation avec des anticorps polyclonaux anti-TLR4 et anti-actine. B. Mêmes conditions que A mais uniquement sur HCMEC/D3 à l'exception du tampon de lyse qui contient cette fois du SDS en plus du NP40.

Pour aller plus loin dans la localisation du récepteur sur les cellules endothéliales, des expériences d'immunomarquages cette fois ci révélés par microscopie de fluorescence pseudo-confocale ont été réalisées. Pour cela, des cellules HCMEC/D3 ont été fixées puis perméabilisées avant d'utiliser d'une part les anticorps anti-TLR4 déjà utilisés pour les Western blots et d'autre part des anticorps anti-golguine97 qui vont permettre de repérer spécifiquement l'appareil de Golgi ce qui doit permettre de voir si TLR4 co-localise bien avec l'appareil de Golgi comme l'ont démontré de précédentes études [83, 117]. Les marquages

sont réalisés sur des cellules non confluentes afin de pouvoir observer la localisation des différentes protéines sur des cellules individualisées.

Les résultats présentés sur la figure 3.18 montrent d'une part que l'utilisation de l'anti-golgine97 donne un marquage ponctuel caractéristique de l'appareil de Golgi et d'autre part un marquage de TLR4 qui se retrouve en partie co-localisé avec l'appareil de golgi. TLR4 est également présent de manière diffuse dans le cytoplasme mais comme attendu, on ne l'observe pas au niveau de la membrane externe des cellules. A l'aide de plugins du logiciel ImageJ, la co-localisation entre l'appareil de Golgi et TLR4 a été quantifiée. Les valeurs caractéristiques permettant de quantifier la co-localisation sont le coefficient de co-localisation de Pearson (R_r) et les coefficients de superposition de Mander (R). Tous deux sont compris entre 0 et 1, la valeur 0 représentant une exclusion parfaite et 1 une co-localisation parfaite. Il y a 2 coefficients de Mander qui différencient la quantité d'une protéine qui co-localise avec l'autre et inversement puisque les deux valeurs ne sont pas forcément identiques. Après soustraction du bruit de fond on obtient $R_r = 0,67$, $R_1 = 0,4$ et $R_2 = 0,79$ (R_1 représente la co-localisation de TLR4 dans l'appareil de Golgi et R_2 la co-localisation de l'appareil de Golgi dans TLR4. On peut donc dire que 79% de l'appareil de Golgi co-localise avec TLR4 mais que 40% de TLR4 est contenu dans l'appareil de Golgi.

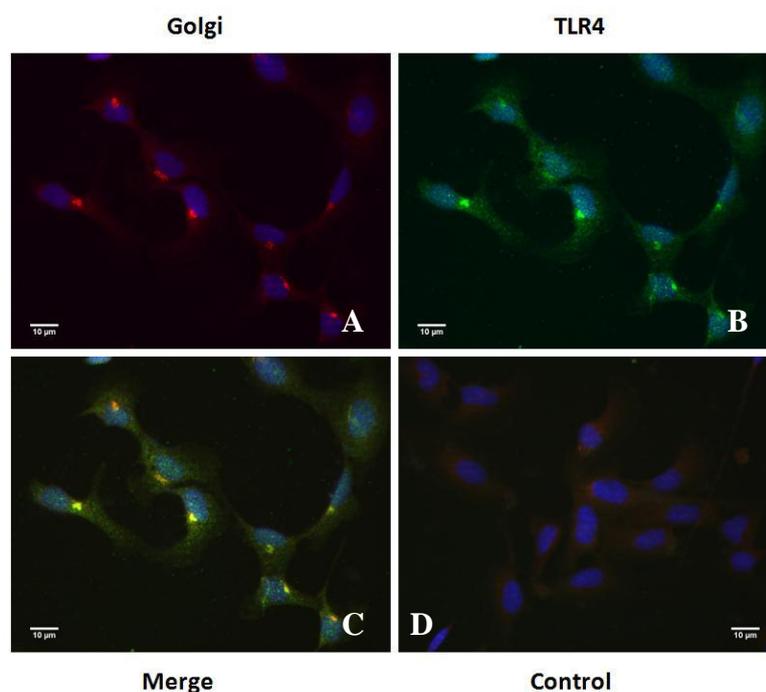


Figure 3.18. Immuno-fluorescence sur des cellules HCMEC/D3 après fixation, perméabilisation et marquage indirect de l'appareil de Golgi (rouge) de TLR4 (vert) et des noyaux (bleu). Images prises avec un système pseudo-confocal APOTOME (Carl Zeiss) pour pouvoir analyser ensuite la co-localisation. Barre d'échelle 10 μ m.

L'ensemble de ces résultats montre que les cellules endothéliales expriment bien le récepteur TLR4 mais pas au niveau de la membrane externe des cellules. Ces résultats sont en accord avec la littérature concernant le fait que malgré le modèle classique du récepteur TLR4 membranaire, il n'a jamais été mis en évidence au niveau de la membrane des cellules endothéliales probablement à cause d'une expression transitoire.

Au final, le récepteur est bien présent dans les cellules HCMEC/D3, et dans la suite de l'étude, il a donc été décidé de mettre en œuvre une stratégie d'inhibition basée sur une technique de *Knock-down*.

3.2.3. *Knock down* du récepteur TLR4 sur les HCMEC/D3

La première étape du *Knock down* du récepteur TLR4 sur les cellules HCMEC/D3 a été de transfecter les cellules avec plusieurs siRNAs ciblant spécifiquement les ARNm codant la protéine. Après optimisation de la stratégie de transfection, il est ressorti que les résultats les plus significatifs sont obtenus en transfectant le mélange de 3 siRNAs en même temps et en réalisant une double transfection avec 48h d'intervalle entre chaque transfection.

La figure 3.19 montre que dans ces conditions on observe une baisse significative de l'expression de TLR4 même si l'inhibition n'est pas totale. En effet, après quantification des bandes correspondant à TLR4 observées en Western blot en normalisant leur intensité par rapport à celle de l'actine (le contrôle de charge), il apparaît que la baisse d'expression de TLR4 par rapport à des cellules non transfectées est d'environ 60%. La baisse d'expression par rapport à des cellules transfectées par un siRNA contrôle est d'environ 40%

Ces résultats montrent qu'il est possible de diminuer fortement mais pas totalement l'expression du récepteur TLR4 dans les cellules HCMEC/D3 même si on observe

régulièrement en parallèle un effet « *off target* », ce qui est courant lorsqu'on utilise ce type de stratégie d'inhibition.

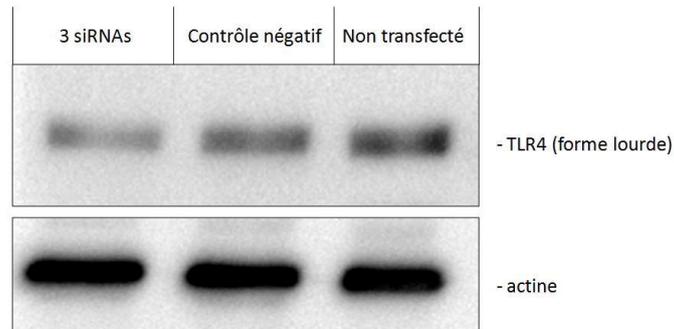


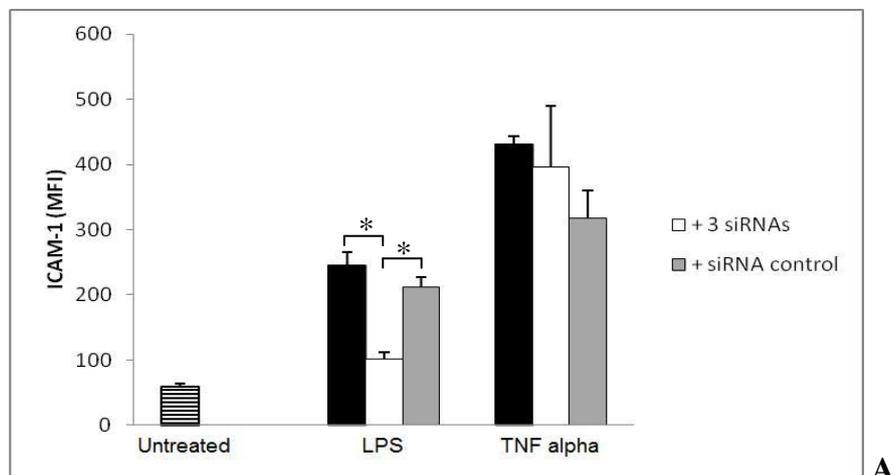
Figure 3.19. Analyse par Western blot de l'expression de TLR4 suite aux transfections par des siRNAs. Les cellules HCMEC/D3 sont transfectées 2 fois avec un mélange des 3 siRNAs à une concentration finale de 20nM (soit 6,6nM par siRNA) avec un agent chimique (Lipofectamine RNAiMAX). Les cellules sont lysées 48h après la deuxième transfection en utilisant le tampon contenant uniquement du NP40 puis on réalise un Western blot (Cf. matériel et méthodes). L'intensité des bandes est finalement quantifiée avec le logiciel Image Lab (BioRad).

Une expérience contrôle visant à vérifier l'efficacité du *Knock down* vis-à-vis de la réponse au LPS a été réalisée. De plus, le fait que le *Knock down* du récepteur TLR4 n'affecte pas la voie d'activation en aval du récepteur ni des récepteurs autres que TLR4 a été également vérifié. Pour cela, des cellules HCMEC/D3 ont été transfectées comme précédemment décrit puis stimulées avec du LPS ou du TNF- α et la réponse inflammatoire a finalement été analysées en mesurant l'expression d'ICAM-1 puis la production d'IL-8.

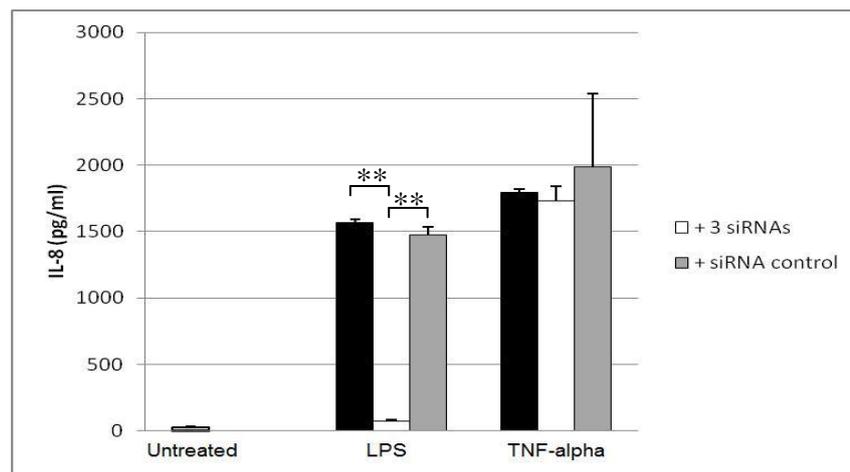
Les résultats présentés sur la figure 3.20 A montrent d'une part que la surexpression d'ICAM-1 en réponse au LPS est en grande partie inhibée après transfection des 3 siRNAs ciblant TLR4 alors que la transfection par un siRNA contrôle n'a pas d'effet significatif. De plus, les cellules HCMEC/D3 sont toujours capables de répondre au TNF- α quelles que soient

les conditions testées, c'est-à-dire qu'elles aient été ou non transfectées par les siRNAs ciblant TLR4 ou le siRNA contrôle.

Les résultats présentés sur la figure 3.20 B montrent le même type de comportement en ce qui concerne la production d'IL-8. En effet, on observe une inhibition presque totale de la production d'IL-8 en réponse au LPS après *Knock down* de TLR4 alors que la réponse au TNF- α n'est pas modifiée. Là encore la transfection par un siRNA contrôle n'induit pas de différences significatives par comparaison avec les conditions où les cellules ne sont pas transfectées.



A



B

*Figure 3.20. Vérification de l'efficacité des Knock down TLR4 sur la réponse des HCMEC/D3 au LPS et au TNF- α . Les cellules sont transfectées comme précédemment puis stimulées 48h après la deuxième transfection avec du LPS à 10ng/ml ou du TNF à 100U/ml avant : A. Analyse de l'expression d'ICAM-1 par cytométrie en flux et B. Analyse de la production d'IL-8 par test ELISA. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$*

3.2.4. Effet du *Knock down* de TLR4 sur la réponse inflammatoire à Env-ms

Dans cette dernière partie de l'étude présentée dans ce manuscrit, le même type d'analyses que celles présentées dans les parties 3.1.1.2 et 3.1.1.4 a été réalisé mais sur des cellules HCMEC/D3 ayant subi un *Knock down* du récepteur TLR4. Cette partie vise à vérifier si les propriétés pro-inflammatoires de l'enveloppe recombinante du MSR/V sont dépendantes de l'expression du récepteur TLR4 par les cellules endothéliales HCMEC/D3 comme cela a déjà été démontré sur d'autres types cellulaires.

3.2.4.1. Effet du *Knock down* sur la surexpression d'ICAM-1 induite par Env-ms

Les cellules HCMEC/D3 ont été transfectées comme décrit précédemment puis traitées par du LPS ou par l'enveloppe recombinante du MSR/V 48 heures après la deuxième transfection. L'expression d'ICAM-1 est ensuite analysée après une nuit de stimulation.

La figure 3.21 montre que la transfection des cellules avec les siRNAs ciblant TLR4 induit une forte chute de la surexpression observée suite au traitement par le LPS et par Env-ms. En effet, après soustraction de l'expression basale d'ICAM-1, on observe une diminution de 74% de l'effet induit par le LPS et de 64% de l'effet induit par Env-ms lorsqu'on compare les cellules transfectées et les cellules non transfectées. Enfin, on note que le témoin négatif n'a pas d'effet significatif par rapport aux cellules non transfectées même si on observe un faible effet *off target* dans le cas de la stimulation au LPS.

Ces résultats montrent que la stimulation de l'expression d'ICAM-1 induite par Env-ms est dépendante de l'expression correcte du récepteur TLR4 puisque l'effet de l'enveloppe rétrovirale est fortement diminué après *Knock down* du récepteur.

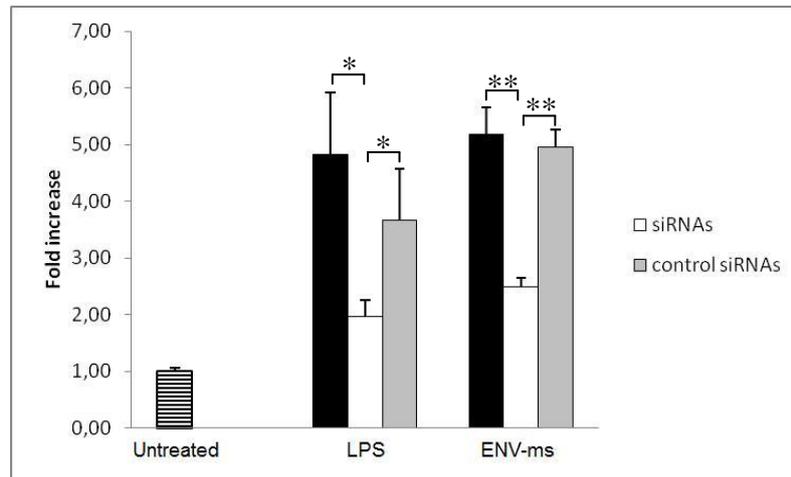


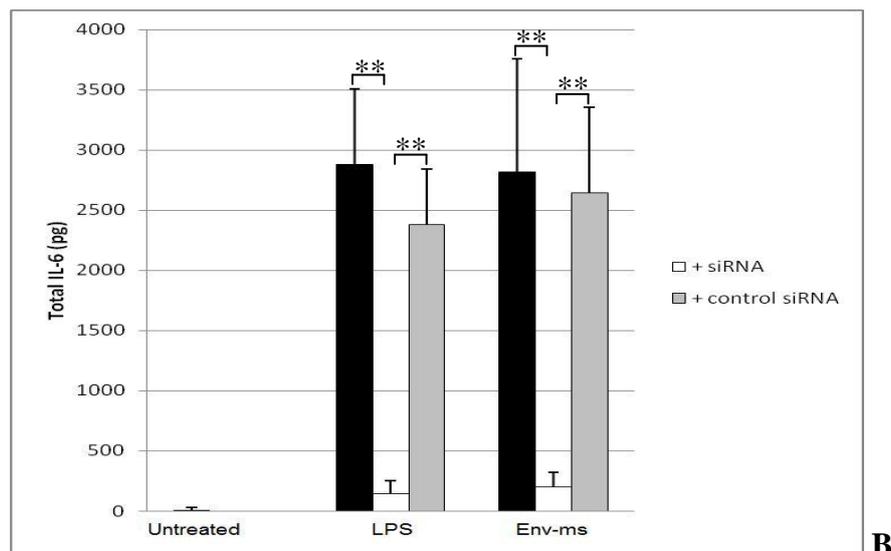
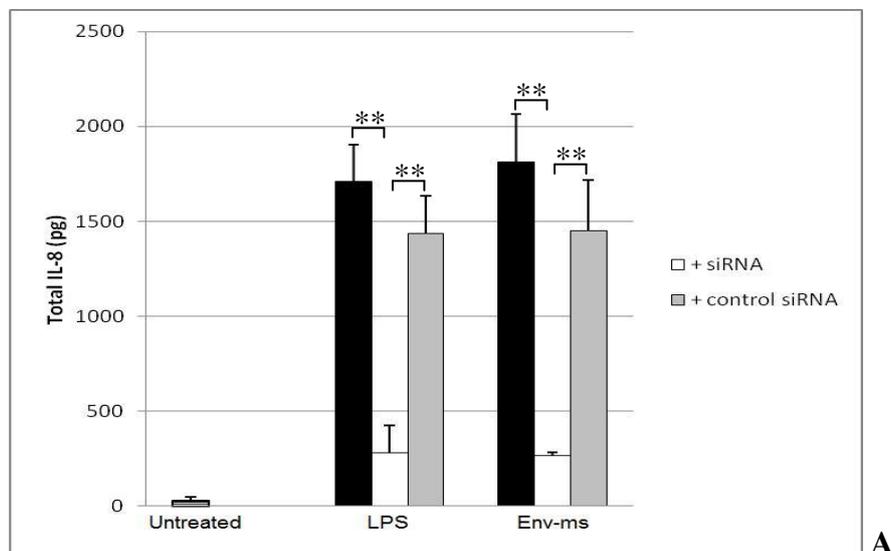
Figure 3.21. Expression d'ICAM-1 par les cellules HCMEC/D3 en réponse à Env-ms et au LPS après *Knock down* de TLR4. Les cellules sont transfectées comme décrit précédemment puis stimulées pour une nuit 48 heures après la deuxième transfection avec du LPS à 100ng/ml ou par Env-ms à 2µg/ml. L'expression d'ICAM-1 est ensuite analysée par cytométrie en flux. Moyennes et écarts types de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicatas. * $p \leq 0,01$
** $p \leq 0,001$

3.2.4.1. Effet du *Knock down* sur la production de cytokines induite par Env-ms

Toujours dans les mêmes conditions de transfection que celles précédemment décrites, la production par les cellules HCMEC/D3 de cytokines pro-inflammatoires en réponse à l'enveloppe recombinante du MSRVA a été mesurée.

La figure 3.22 montre que le *Knock down* de TLR4 induit une forte inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse au LPS et à Env-ms. En effet on observe une diminution de 85% de l'effet induit par le LPS et de 87% de celui induit par Env-

ms lorsqu'on compare la production d'IL-8 par les cellules transfectées et non transfectées (Fig. 3.22 A). De la même façon, on observe une diminution de 95% de l'effet induit par du LPS et de 93% de celui induit par Env-ms lorsqu'on s'intéresse à la production d'IL-6 (Fig 3.22 B). On notera enfin que la transfection par les siRNAs contrôles a une légère tendance à inhiber la production de cytokines (effets *off target*) mais cette tendance n'est statistiquement significative que lors de l'analyse de la production d'IL-8 ($p = 0,03$) lorsqu'on compare les cellules transfectées par les siRNAs contrôles et les cellules non transfectées.



*Figure 3.22. Production de cytokines par les cellules HCMEC/D3 en réponse à Env-ms et au LPS après Knock down de TLR4. Les cellules sont transfectées comme décrit précédemment puis stimulées pour une nuit 48 heure après la deuxième transfection avec du LPS à 100ng/ml ou par Env-ms à 2µg/ml. La production d'IL-8 (A) et d'IL-6 (B) dans les surnageants est ensuite analysée par des tests ELISA. Moyennes et écarts types de 2 expériences indépendantes réalisées en triplicatas. ** $p \leq 0,001$*

L'ensemble de ces résultats montre clairement que le *Knock down* du récepteur TLR4 par les siRNAs abolit en grande partie la réponse inflammatoire à Env-ms montrant de ce fait l'implication du récepteur dans la reconnaissance de l'enveloppe rétrovirale et dans la transduction du signal pro-inflammatoire qui en résulte.

Chapitre 4 : Discussion

4.1. Effets inflammatoires et spécificité d'action sur le modèle HCMEC/D3

Les expériences présentées dans la première partie des résultats montrent clairement que l'enveloppe recombinante du MSR.V possède un effet pro-inflammatoire sur les cellules HCMEC/D3 puisqu'elle induit une surexpression d'ICAM-1 ainsi qu'une forte production de cytokines pro-inflammatoires, tout cela avec une bonne reproductibilité même si une certaine variabilité a été observée dans les niveaux de la réponse cellulaire.

Au niveau des témoins d'inflammation utilisés lors de l'étude, nous nous sommes concentrés sur 3 marqueurs principaux, une molécule d'adhésion impliquée dans une étape précédant la diapédèse (ICAM-1) et 2 cytokines pro-inflammatoires majeures (l'IL-6 et l'IL-8). Ces marqueurs sont suffisants pour pouvoir affirmer que Env-ms exerce bien un effet pro-inflammatoire sur les modèles étudiés. Toutefois, pour aller plus loin et ainsi compléter l'étude, il serait pertinent de s'intéresser à d'autres marqueurs connus pour être stimulés sur le modèle HCMEC/D3 en conditions inflammatoires comme VCAM-1, les molécules du CMH de classe 2, CD40 (une molécule de co-stimulation) [81] ou bien encore MCP-1 dont la surexpression est connue sur le modèle HUVEC [83] et également sur le modèle HCMEC/D3 comme le suggèrent des données récentes [118].

Un point important abordé dans cette partie de l'étude concernait la spécificité d'action de l'enveloppe du MSR.V. On peut tout d'abord dire que son effet est bien spécifique par rapport à celui de la syncytine. En effet, malgré une forte homologie de séquence, les effets observés sont différents puisque la syncytine n'a pas d'action pro-inflammatoire significative sur les cellules endothéliales comparée à celle de Env-ms. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que les 7% de différences entre la séquence de Env-ms et la séquence de la syncytine sont suffisants pour induire des modifications conformationnelles significatives aboutissant à une différence d'affinité des deux protéines vis-à-vis du récepteur TLR4. De ce fait l'une induit la transduction d'un signal fort alors que l'autre n'a pas ou peu d'effet.

D'autre part, les expériences visant à inhiber l'effet de Env-ms par l'utilisation d'anticorps monoclonaux neutralisants pour démontrer l'effet spécifique de la protéine recombinante ont été des plus difficiles à réaliser et à reproduire de façon satisfaisante. Le fait que l'inhibition des effets induits par Env-ms soit incomplète la plupart du temps pourrait s'expliquer par un manque d'affinité antigène-anticorps ou par une neutralisation incomplète qui conduirait à laisser libre une partie de la protéine. Elle continuerait de ce fait à interagir avec son récepteur sur les cellules endothéliales. Mais la cause la plus probable permettant d'expliquer ces difficultés à inhiber l'action de Env-ms serait plutôt la tendance de cette protéine recombinante à former des agrégats en solution. En effet, nous avons pu observer ces agrégats en microscopie à fluorescence après marquage par les anticorps monoclonaux (non présenté). Cela pourrait expliquer nos difficultés à inhiber son effet puisque les complexes formés seraient trop gros pour être correctement neutralisés par des anticorps. Nous avons enfin pu remarquer que ces agrégats étaient a priori éliminables par centrifugation puisqu'on les voit disparaître en microscopie. C'est pourquoi toutes les expériences de neutralisation présentées dans ce manuscrit ont été faites après centrifugation de la solution d'enveloppe recombinante. Il reste cependant difficile de vérifier leur élimination totale lors des expériences faisant intervenir des anticorps neutralisants.

De manière surprenante, nous avons aussi remarqué en testant différents lots d'enveloppe recombinante, que seuls certains d'entre eux présentent une activité biologique significative sur les cellules endothéliales alors que des résultats de travaux effectués au sein de notre laboratoire montrent que les lots qui n'ont pas d'action sur les cellules endothéliales exercent bien un effet pro-inflammatoire sur d'autres types cellulaires comme les monocytes ou les macrophages. Les variations d'activité que l'on observe en fonction des lots pourraient s'expliquer par des différences de conformation des protéines dépendantes du mode de production et des techniques de purification. En effet l'enveloppe recombinante est produite par des bactéries *E. coli* ce qui ne permet pas d'avoir accès à l'ensemble des modifications post-traductionnelles ayant lieu dans des cellules eucaryotes. L'activité *in vitro* de Env-ms que nous avons observé dans notre étude pourrait ne refléter qu'en partie celle qu'elle possède réellement *in vivo*.

Malgré ces observations, en se basant sur les résultats obtenus concernant l'inhibition par les anticorps monoclonaux et sur le fait qu'il n'y ait pas de contamination par une endotoxine dans le lot d'enveloppe recombinante qui a été utilisée dans toutes les expériences présentées

dans cette étude, on peut affirmer avec certitude que les effets observés sont bien spécifiques de la protéine recombinante.

4.3. Effets inflammatoires sur le modèles HUVEC

Lorsqu'on compare les résultats obtenus sur le modèle HCMEC/D3 et ceux obtenus sur le modèle HUVEC, on s'aperçoit que le profil inflammatoire des deux modèles est très similaire malgré quelques différences notables. La protéine d'enveloppe Env-ms semble exercer une activité pro-inflammatoire légèrement plus importante sur des cellules endothéliales provenant du cerveau que sur celles provenant du cordon ombilical. En effet, Env-ms induit une surexpression d'ICAM-1 et la production d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules HCMEC/D3 alors que les HUVECs répondent de la même façon à l'enveloppe recombinante excepté pour la production d'IL-6 qui est négligeable. Ces observations ne sont pas dues à des différences dans le niveau d'expression du récepteur TLR4 puisque nous avons pu vérifier qu'il était exprimé de façon similaire sur les deux types cellulaires (Figure 3.17 A). Une quantification des niveaux d'expression montre même plutôt une expression légèrement plus forte dans les cellules HUVEC.

Concernant les différences observées au niveau de la production de cytokines, les HUVECs sont connues pour produire des quantités d'IL-6 beaucoup plus faibles que celles d'IL-8 en réponse au LPS tandis que leur réponse au TNF- α est assez controversée et semble dépendre des conditions de cultures. Ce point a déjà été discuté dans l'étude de Mako et al. [83] et il en ressort que la production d'IL-6 en réponse au TNF- α peut varier fortement en fonction des lots de sérum utilisé dans les milieux de culture. En effet il peut y avoir des endotoxines dans le sérum qui exercent alors un effet en synergie avec le TNF- α conduisant à une forte production d'IL-6 alors que cette production est beaucoup plus faible lorsque le sérum ne contient pas d'endotoxines. Ces observations pourraient expliquer l'absence d'une production significative d'IL-6 par les cellules HUVECs en réponse au TNF- α dans notre étude.

En revanche, nous avons pu observer que les HUVECs utilisées dans l'étude présentée ici sont capables de produire des quantités significatives d'IL-6 en réponse à du LPS (non présenté) mais pas en réponse à Env-ms (Figure 3.15). Une hypothèse qui pourrait expliquer

ce phénomène serait que les variations observées entre les effets du LPS et les effets de Env-ms sur la production d'IL-6 pourraient être dues à une légère différence entre les voies de signalisation activées en aval du récepteur TLR4 suivant le ligand rencontré (LPS ou Env-ms). Ce phénomène n'est pas observé sur les cellules HCMEC/D3 qui sont capables de produire des quantités importantes d'IL-6 à la fois en réponse au LPS et en réponse à l'enveloppe recombinante du MSR.V.

Au final, malgré les différences observées entre le modèle HUVEC et le modèle HCMEC/D3, on peut affirmer que Env-ms exerce une activité pro-inflammatoire sur les deux types cellulaires.

4.3. Effets des transfections des enveloppes rétrovirales dans les HCMEC/D3

L'objectif principal de cette partie de l'étude était de voir si l'enveloppe du MSR.V avait un effet pro-inflammatoire lorsqu'elle est exprimée de manière endogène par comparaison avec les expériences précédentes lors desquelles on apporte une enveloppe recombinante de manière exogène.

Les résultats montrent que la protéine peut être exprimée par les cellules HCMEC/D3 mais malgré la présence de parties transmembranaires, extracellulaires et intra-cytoplasmique (le vecteur transfecté code la protéine complète et non pas seulement l'unité de surface), elle ne semble pas s'exprimer à la membrane. Corrélé à cela, on n'observe pas de modification de la morphologie des cellules, par comparaison au phénotype observé lorsqu'on transfecte la syncytine. Il ne semble pas non plus y avoir d'effet sur l'expression d'ICAM-1 mais pour que l'étude de ce paramètre soit plus pertinente il faudrait réaliser un double marquage Env-ms / ICAM-1 de façon à pouvoir sélectionner les cellules exprimant fortement l'enveloppe avant de mesurer l'expression d'ICAM-1 uniquement sur ces cellules. En effet, nos résultats montrent que parmi toutes les cellules ayant intégré le gène de sélection, seule un petit nombre exprime l'enveloppe assez fortement pour qu'elle soit détectable après les marquages. Cependant, lorsque l'on trace un histogramme de l'expression d'ICAM-1 par les cellules transfectées à partir des données brutes de cytométrie (similaire à celui présenté sur la figure 3.2 B), on observe une distribution homogène suivant une courbe gaussienne ce qui laisse

supposer que même les cellules exprimant effectivement l'enveloppe ne surexpriment pas pour autant ICAM-1. Si c'était le cas, on observerait une distribution avec 2 populations, l'une exprimant ICAM-1 à un niveau basal et une exprimant fortement ICAM-1 et qui pourrait correspondre à la population de cellules exprimant aussi l'enveloppe.

Les résultats montrent que l'enveloppe transfectée est exprimée par certaines cellules mais reste distribuée de manière intracellulaire. Il se peut qu'une forme soluble puisse être sécrétée par les cellules transfectées. Il serait intéressant de vérifier cela puisque les outils permettant de doser l'enveloppe soluble existent désormais (mais n'existaient pas au moment où ces expériences ont été réalisées) [16].

Par ailleurs, ces résultats sont en accord avec le fait que la forme intra-cellulaire du récepteur TLR4 ne soit pas une forme mature active, capable de transmettre un signal pro-inflammatoire [98] mais ce point sera abordé plus en détails dans la section 4.4 ci-après.

On notera enfin qu'afin d'étudier les effets des enveloppes rétrovirales lorsqu'elles sont exprimées de manière endogène, un modèle murin est actuellement en cours de développement. Dans ce modèle, l'enveloppe du MSRNV devrait pouvoir être exprimée dans les cellules gliales et de manière inductible ce qui doit permettre à terme d'obtenir un nouveau modèle animal pour l'étude du rôle du MSRNV dans la SEP.

4.3. Etude fonctionnelle des effets de l'enveloppe du MSRNV sur les phénomènes d'adhésion.

Les résultats des tests fonctionnels présentés dans cette étude montrent clairement que l'enveloppe recombinante du MSRNV induit une augmentation de l'adhérence de cellules immunitaires activées à la monocouche de cellules HCMEC/D3. Ce résultat est en accord avec le fait que l'enveloppe recombinante induise une surexpression d'ICAM-1 sur cette même monocouche puisque ICAM-1 permet justement l'adhésion des leucocytes à l'endothélium lors de l'étape d'adhésion forte qui précède la diapédèse. L'augmentation du nombre de cellules ayant adhéré est d'environ 2,5 fois par rapport au contrôle non stimulé alors que l'augmentation de l'expression d'ICAM-1 est de plus de 6 fois celle du contrôle après traitement par la même concentration d'enveloppe. Cela peut s'expliquer certainement par le fait que les cellules HL-60 sont lavées de manière extensive après l'étape adhésion se

qui a pour effet de détacher beaucoup de cellules encore en cours d'adhésion ou adhérentes trop faiblement. Il se pourrait également que toutes les molécules d'ICAM-1 ne soient pas fonctionnelles et capables d'intervenir dans l'attachement d'un leucocyte. De ce fait, l'expression d'ICAM-1 mesurée en cytométrie en flux n'est pas forcément proportionnelle au nombre de cellules pouvant adhérer à la monocouche.

Initialement, l'objectif de l'étude fonctionnelle était d'aboutir à la mise au point d'un système de culture des HCMEC/D3 en chambre de Boyden afin de mesurer la perméabilité des monocouches de cellules endothéliales vis-à-vis des cellules HL-60 activées ou vis-à-vis de petites molécules solubles (comme le Lucifer Yellow habituellement utilisé dans ce type de tests). Malheureusement, tous les essais visant à cultiver les cellules endothéliales sur des membranes perméables n'ont pas donné de résultats satisfaisants puisque nous n'avons jamais pu mesurer des différences de perméabilité des monocouches en fonction des différents traitements comme du TNF- α qui est censé induire une ouverture des jonctions et une augmentation du nombre des cellules pouvant traverser la monocouche. L'hypothèse principale qui permettrait d'expliquer ces observations est l'incapacité des cellules à former des jonctions serrées correctement dans nos conditions de culture. En effet, les résultats présentés au tout début de l'étude (Figure 3.1 D et E) montrent que la distribution des protéines impliquées dans la formation des jonctions serrées comme ZO-1 et la claudine-3 n'est pas correcte puisqu'elle n'est pas observée au niveau des jonctions cellulaires contrairement à la VE-cadhérine par exemple. Le même problème a été observé pour la claudine-5 (non présenté). Des tests ont été réalisés en modifiant la composition du milieu de culture, en particulier en augmentant la concentration en hydrocortisone ce qui devrait avoir pour effet d'augmenter l'expression des claudines et occludines [119], mais ces tests ne nous ont pas permis d'observer de différences significatives dans l'expression des protéines impliquées dans la formation des jonctions serrées.

Ces résultats montrent que même si la monocouche est formée correctement avec des cellules jointives, les jonctions serrées restent immatures. Cela ne pose pas de problème pour la mesure des paramètres inflammatoires tels que l'expression d'ICAM-1 ou la production de cytokines. En revanche, un remodelage des jonctions serrées et adhérentes est nécessaire pour que les cellules endothéliales puissent moduler la perméabilité de la monocouche en réponse à des stimuli externes de type pro-inflammatoires. Le bon fonctionnement d'un test de transmigration dépend donc de l'expression correcte des protéines telles ZO-1 ou les claudines, qui sont nécessaires à la formation des jonctions serrées, ce qui n'est pas le cas ici.

De plus, nous avons eu accès pendant un court laps de temps à un appareil permettant de mesurer la résistance électrique trans-endothéliale (TEER) des monocouches de cellules endothéliales cultivées dans les mêmes conditions que pour les tests de migration trans-endothéliale. Les résultats obtenus (non présentés) sont en accord avec le fait que les jonctions serrées qui s'établissent dans nos conditions de culture par les HCMEC/D3 ne présentent pas des caractéristiques correctes. En effet, les valeurs de TEER que nous avons pu mesurer sur les HCMEC/D3 se trouvaient autour de $20 \Omega/\text{cm}^2$ au maximum, alors que cette valeur devrait plutôt s'établir à plus de $40 \Omega/\text{cm}^2$ après 5 jours de confluence [82]. Un suivi sur plusieurs jours de l'évolution des valeurs de TEER a également montré que ce paramètre n'était pas stable dans le temps et n'était pas non plus affecté de manière significative par l'ajout d'une cytokine pro-inflammatoire comme le TNF- α .

Les observations faites à partir la figure 3.1 et les mesures complémentaires effectuées permettent de penser que le modèle HCMEC/D3 ne possède pas les caractéristiques requises pour effectuer des tests fonctionnels de migration trans-endothéliale dans nos conditions de culture. Il serait cependant possible d'améliorer la pertinence du modèle en complexifiant le système de culture.

En effet, une étude récente montre qu'il est possible d'augmenter significativement la TEER des monocouches HCMEC/D3 en les cultivant dans une chambre de Boyden et en plaçant des astrocytes dans le compartiment basal, en contact direct avec la monocouche de cellules endothéliales [82]. Sur des modèles de barrière hémato-encéphalique non-humains utilisant des co-cultures de cellules endothéliales et de cellules gliales provenant de différentes espèces (cellules endothéliales de porc et cellules gliales de rat) il a également été montré que cette augmentation de la TEER était corrélée à une augmentation de l'expression des protéines de jonction claudine et occludine [120]. Il semble donc possible d'améliorer la pertinence du modèle utilisé dans notre étude en mettant en place un système de co-culture avant de réaliser des expériences fonctionnelle de migration.

Cependant, en ce qui concerne le modèle HCMEC/D3, les résultats publiés concernant les effets de la co-culture sur l'étanchéité des jonctions serrés sont déjà controversés puisqu'une étude très récente ne retrouve pas de différences significatives sur les valeurs de TEER lorsqu'on compare des cellules endothéliales seules et des cellules en co-culture [121]. Cette étude met également en évidence le fait que la co-culture des cellules HCMEC/D3 avec des astrocytes induit une baisse de l'expression de certains gènes impliqués dans les phénomènes de migration trans-endothéliale comme ICAM-1. Cette dernière observation montre que la co-

culture avec des astrocytes permet de se rapprocher des conditions physiologiques où l'entrée des cellules immunitaires dans le système nerveux central doit être restreinte de manière à conserver le privilège immunitaire de cet organe. Mais si l'on s'intéresse justement aux phénomènes de migration trans-endothéliale *in vitro* et que l'on cherche à mettre en évidence des différences suite aux divers traitements, le système-de co-culture risque se révéler handicapant si la surexpression des molécules d'adhésion observée jusqu'ici sur des systèmes en monoculture n'est plus suffisante pour aboutir à des niveaux de migration trans-endothéliale mesurables.

Il faut enfin remarquer qu'avec ou sans système de co-culture, les valeurs de TEER du modèle HCMEC/D3 sont très faibles par comparaison à celles que l'on trouve réellement *in vivo* et que l'on estime entre $1500 \Omega/\text{cm}^2$ et $2000 \Omega/\text{cm}^2$ [78, 122, 123] ce qui montre que l'étanchéité des jonctions qui peuvent s'établir *in vitro* est bien différente de celle retrouvée *in vivo*, même si certains modèles non-humains parviennent à s'en approcher [120].

Dans l'ensemble, ces observations illustrent la difficulté de mise au point d'un modèles de barrière hémato-encéphalique qui soit pertinent vis-à-vis de la formation des jonctions serrées et donc vis-à-vis de tests fonctionnels de migration trans-endothéliale. C'est pourquoi ce type de test a été finalement abandonné dans l'étude présentée dans ce manuscrit.

4.4. Expression du récepteur TLR4 par les cellules endothéliales

Une partie importante de l'étude présentée ici a été consacrée au récepteur TLR4 puisqu'initialement c'est ce récepteur qui a été montré comme capable de reconnaître la protéine d'enveloppe du MSR/V [34]. Lorsque nous avons cherché, à mettre en évidence TLR4 sur les cellules HCMEC/D3, les résultats obtenus ont été surprenants mais restent au final cohérents.

La première observation effectuée par Western blot (Figure 3.17) a permis de mettre en évidence au moins deux isoformes du récepteur TLR4 sur les cellules HCMEC/D3 (une bande simple et un doublet) qui ne correspondaient pas au poids moléculaire attendu pour cette protéine. L'explication la plus probable qui permettrait d'expliquer ces observations est celle mettant en jeu différents états de glycosylation. En effet une étude avait déjà démontré qu'il pouvait exister plusieurs formes de TLR4 avec différents niveaux de glycosylation [98]. Bien

que les poids moléculaires mesurés dans cette étude soient encore différents de ceux que nous avons pu observer, il faut noter que l'étude d'Onhishi a été faite dans des cellules HEK alors que notre étude prend place dans des cellules endothéliales. Il est donc possible que le récepteur ne reçoive pas la même quantité ni le même type de glycosylations en fonction du type cellulaire étudié. Le fait que l'on puisse parfois observer un doublet pour la forme lourde, comme sur la figure 3.17 B ou de manière moins marquée sur la figure 3.19 est également un argument en faveur du fait que TLR4 reçoive bien différents niveaux de glycosylation puisque cette observation d'un doublet est courante pour ce type de modification post-traductionnelle.

De manière intéressante, l'étude d'Onhishi montrait aussi que la forme légère de TLR4 correspond à une forme immature qui ne peut pas prendre part à la reconnaissance d'un ligand alors que la forme lourde est une forme mature qui peut être exprimée à la membrane et transmettre un signal inflammatoire. Or il se trouve que nous avons remarqué que la forme lourde est plus abondante que la forme légère lorsqu'on tente d'extraire uniquement les protéines membranaires avec un tampon contenant seulement du NP40. Dans la plupart des cas, la forme légère disparaît quasi-totalement au profit de la forme lourde lorsqu'on réalise ce type d'extraction. Ces observations ne permettent pas de prouver qu'il existe bien une forme membranaire de TLR4 sur les cellules HCMEC/D3 mais le laissent fortement supposer.

Effectivement, nous n'avons pas pu mettre en évidence de TLR4 membranaire sur les HCMEC/D3 par cytométrie en flux ou en microscopie. L'absence du récepteur à la membrane, ou plutôt notre incapacité à le détecter va à l'encontre du modèle classique du TLR4 mais c'est une caractéristique déjà connue sur les cellules endothéliales. En effet, il a été montré qu'il était impossible d'inhiber l'action du récepteur par des anticorps neutralisants sur des cellules HUVEC ce qui est en accord avec le fait qu'il ne soit pas à la membrane [116]. De plus, les expériences menées en microscopie dans notre étude sur les cellules HCMEC/D3 ainsi que dans d'autres études déjà publiées concernant des cellules HUVEC [83] ou même des cellules épithéliales [117] montrent que TLR4 se trouve en grande partie dans l'appareil de Golgi mais n'est pas visible au niveau la membrane.

L'ensemble de ces observations suggère que TLR4 existe sous forme mature et immature dans les cellules HCMEC/D3 (et HUVEC même si nous n'avons pas cherché à approfondir l'étude de sa localisation sur ces cellules). La forme immature qui disparaît lors de l'extraction avec du NP40, doit majoritairement résider dans un organe intracellulaire, probablement l'appareil de Golgi. La forme mature doit, elle, se trouver majoritairement dans

des vésicules cytoplasmiques mais cela n'exclue pas qu'elle puisse être exprimée au moins transitoirement au niveau de la membrane externe. Le fait que cette expression à la membrane soit transitoire expliquerait pourquoi TLR4 n'y est pas détecté par immunomarquage et pourquoi il n'est pas inhibé par des anticorps neutralisants. En accord avec cette hypothèse, il a déjà été montré qu'il existait un trafic rapide du TLR4 entre l'appareil de Golgi et la membrane cytoplasmique [124] (revue de Mc Gettrick et O'Neill [99]).

Enfin, un élément supplémentaire laisse supposer que la forme cytoplasmique de TLR4 est immature et inactive. En effet lorsque nous avons essayé de transférer l'enveloppe du MSR/V dans des cellules HCMEC/D3, nous avons pu observer qu'elle était exprimée dans le cytoplasme alors que les cellules transfectées n'étaient pas pour autant stimulées. Si le TLR4 intra-cytoplasmique était actif, il est probable que les cellules auraient répondu à l'expression de l'enveloppe en surexprimant ICAM-1 puisqu'elles sont capables de le faire lorsque la protéine d'enveloppe recombinante est présentée de manière exogène.

4.5. Le *Knock down* de TLR4 et ses effets

Les résultats présentés dans la dernière partie de l'étude décrite ici (section 3.2.3 et 3.2.4) montrent clairement un effet du *Knock down* du récepteur TLR4 sur la réponse inflammatoire induite par l'enveloppe du MSR/V. En effet, la transfection par des siRNA ciblant spécifiquement le récepteur conduit à une inhibition quasi-complète de la production de cytokines pro-inflammatoires induite en réponse au traitement par le ligand classique du récepteur (le LPS) ou par l'enveloppe recombinante du MSR/V par rapport à des cellules non transfectées ou transfectées par un siRNA contrôle. La transfection conduit également à une inhibition de plus de 50% de la surexpression d'ICAM-1 induite dans les mêmes conditions.

Le fait que la surexpression d'ICAM-1 ne soit pas totalement inhibée (de même que pour la sécrétion de cytokines) provient certainement du fait que la transcription du récepteur n'est pas totalement abolie comme le montre la vérification par Western blot de l'efficacité des siRNA (Figure 3.19) puisque la protéine est encore exprimée et détectée après transfection par les siRNA. Cette expérience de vérification montre également que les siRNA peuvent avoir des effets « *off target* » puisque la transfection par un siRNA contrôle peut aussi induire une baisse d'expression du récepteur. Cependant, on remarque par la suite que ces effets *off target* n'ont finalement pas d'impact significatif sur la réponse inflammatoire du modèle

HCMEC/D3 puisque d'une part les siRNA contrôle n'ont qu'un effet limité, non significatif sur la production de cytokines et sur l'expression d'ICAM-1 (Figures 3.21 et 3.22) par comparaison avec la réponse des cellules non transfectées, excepté lorsqu'on mesure la production d'IL-8 (Figure 3.22 A) où la transfection par un siRNA contrôle induit une baisse légère mais significative ($p = 0,03$) de la production de cette cytokine. D'autre part nous avons pu montrer que la transfection par les siRNA n'avait pas non plus d'impact sur une autre voie de l'inflammation passant par le récepteur du TNF. La transfection n'a donc pas d'effet sur la voie NF- κ B ou sur l'expression d'un autre récepteur et ne rend donc pas les cellules anergiques.

Finalement, l'ensemble de ces résultats montre que le récepteur TLR4 est bien impliqué dans la reconnaissance de l'enveloppe du MSR/V par les cellules HCMEC/D3 ainsi que dans la transduction d'un signal aboutissant à une réponse inflammatoire des cellules endothéliales.

Pour aller plus loin dans l'étude des mécanismes de reconnaissance de l'enveloppe du MSR/V, il pourrait être judicieux de s'intéresser au rôle de la protéine MD-2 qui apparaît comme indispensable à la reconnaissance d'un ligand par le récepteur TLR4 [125, 126]. Pour cela, une approche de Knock Down utilisant des siRNA de la même façon que ce qui a été réalisé dans cette étude concernant TLR4 paraît bien indiquée. Si les deux protéines fonctionnent de manière indissociable l'une de l'autre, on pourrait ainsi s'attendre à une abolition des effets pro-inflammatoires de Env-ms après Knock Down de MD-2 de la même façon que pour TLR4.

4.6. Activité pro-inflammatoire de l'enveloppe, quels sont les mécanismes à l'origine de ce phénomène ?

L'étude présentée ici apporte quelques évidences supplémentaires des propriétés pro-inflammatoires de l'enveloppe du MSR/V, propriétés qui pourraient contribuer au développement de certaines pathologies comme la SEP. Ces observations amènent à s'interroger sur le rôle initial de la protéine d'enveloppe notamment concernant l'effet de cette activité pro-inflammatoire sur le cycle de vie du virus.

Il est difficile d'avoir accès à des données concernant le cycle de vie du MSR/V du fait que les virus de la famille HERV-W sont retrouvés chez les primates et les humains. Il peut donc

être intéressant de raisonner par analogie entre le MSR/V, dont certaines propriétés ont été analysées dans cette étude, et les MMTV qui sont des rétrovirus murins largement étudiés dans les années 90. Les MMTV (pour Mouse Mammary Tumor Virus) sont des rétrovirus qui sont produits et transmis par le lait maternel et qui provoquent des tumeurs mammaires. Comme tous les rétrovirus, leur génome s'intègre dans le génome de l'hôte. Certaines de ces copies ont été intégrées dans les cellules germinales (Mtv) et sont ainsi transmises par les parents. Les gènes Mtv sont associés à l'expression de protéines qui déterminent des groupes tissulaires (Mls : Minor Lymphocyte Stimulating antigen) provoquant de fortes stimulations immunitaires par l'activation de lymphocytes T [46].

Les deux familles de rétrovirus, MMTV/Mtv et MSR/V/HERV-W, partagent certaines propriétés :

- d'une part, le fait d'encoder une protéine exerçant une activité de type « superantigène » qui conduit à l'activation de lymphocytes T caractérisés par l'utilisation de certaines régions variables de la chaîne β du TCR; en conséquence les fréquences de réponse des lymphocytes ciblés sont particulièrement grandes pouvant aller jusqu'à plusieurs pourcents des lymphocytes T, alors que les fréquences de réponse de lymphocytes T reconnaissant un antigène dépend des utilisations combinées des régions variables des deux chaînes du TCR et sont bien inférieures au millionième.

- d'autre part le fait d'activer des cellules exprimant le TLR4, notamment des monocytes et cellules dendritiques, conduisant à une stimulation immunitaire.

Dans le cas du MMTV, la production d'un superantigène fait partie de la stratégie du virus pour accomplir son cycle infectieux puisqu'elle permet d'amplifier l'infection des cellules B qui constituent le réservoir du virus (Figure 4.1). Cependant, nous ne possédons que peu de données sur le cycle viral du MSR/V, notamment *in vivo*. Il est probable que les particules ainsi que la protéine d'enveloppe retrouvées chez les patients ou dans les surnageants de culture, proviennent d'un provirus endogène dont les séquences seraient réactivées sous l'action de facteurs environnementaux.

Dans le cadre de cette hypothèse et par analogie avec le MMTV on peut suggérer que les activités superantigènes et pro-inflammatoires de l'enveloppe du MSR/V seraient plutôt un reste de la fonction qu'avait la protéine dans le cycle infectieux du rétrovirus initial avant l'intégration de ces séquences dans le génome.

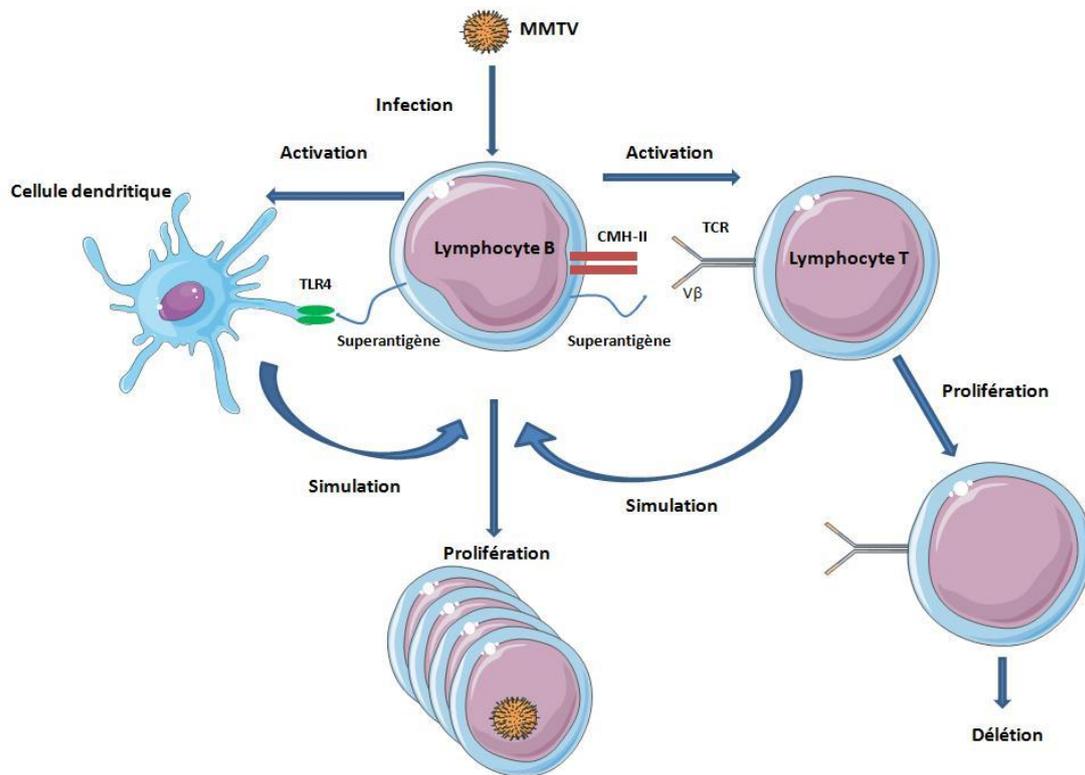


Figure 4.1. Schéma montrant les étapes de l'infection d'un lymphocyte B par le MMTV. L'expression du superantigène codé par le MMTV active les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigène comme les cellules dendritiques qui en retour stimulent la prolifération des lymphocytes B infectés. Adapté d'après Held et al.1994 [127].

Chapitre 5 : Conclusion / perspectives

Depuis sa découverte en 1989, les propriétés inflammatoires et potentiellement pathogènes du MSRNV ont été démontrées à plusieurs reprises ainsi que son lien avec la SEP [14, 16, 17, 34, 128]. De plus les indices de son implication dans d'autres pathologies neuro-inflammatoires comme la schizophrénie s'accumulent [11, 15, 111, 129-132]. Ainsi, il apparaît de plus en plus certain que les rétrovirus endogènes humains jouent un rôle dans certaines pathologies neuro-inflammatoires [133]. Cependant, il n'est toujours pas communément admis que ces rétrovirus puissent jouer un rôle non négligeable dans la pathogenèse de ces maladies probablement du fait que ces pathologies soient multifactorielles. L'hypothèse des rétrovirus endogènes humains est donc « noyée dans la masse » des nombreuses études visant à identifier des facteurs de prédisposition ou de nouvelles cibles thérapeutiques, également nécessaires au demeurant.

L'étude présentée dans ce manuscrit démontre que le MSRNV exerce une activité pro-inflammatoire sur des cellules endothéliales cérébrales via l'unité de surface de sa protéine d'enveloppe qui est reconnue par le récepteur TLR4. De ce fait, nous apportons simplement une pièce supplémentaire au puzzle que constitue l'hypothèse des rétrovirus endogènes dans le contexte de la SEP comme rappelé sur la figure 5.1, et faisons le lien entre l'activation des cellules immunitaires qui a déjà été démontrée [34, 50] et leur entrée dans le système nerveux central ou elle vont aller causer des dommages à la myéline.

De plus, le fait que l'enveloppe exerce aussi un effet sur des cellules endothéliales ne provenant pas du cerveau laisse supposer qu'elle pourrait avoir un effet systémique et activer potentiellement tous les types cellulaires capables d'exprimer TLR4 et de répondre à une stimulation de ce récepteur. Ainsi le MSRNV pourrait être impliqué dans des pathologies autres que celles déjà décrites même si son expression n'est pas ubiquitaire dans les maladies inflammatoires puisqu'il n'est pas retrouvé par exemples chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde [134].

Les perspectives directes de ce travail, outre les analyses complémentaires de certains paramètres inflammatoires citées dans la section 4.1 et l'amélioration du modèle de BHE en ce qui concerne les jonctions serrées et les tests fonctionnels, auront surtout pour objectif d'étudier les effets de l'enveloppe du MSRNV sur un modèle murin actuellement en cours de développement. En effet 2 types de souris transgéniques sont en cours de mise au point. La

première lignée exprimera l'enveloppe du MSR_V sous le contrôle d'un promoteur du CMH de classe 2 et ciblera donc l'expression de la protéine dans les cellules présentatrices d'antigène. L'autre lignée exprimera l'enveloppe de manière inductible sous le contrôle d'un promoteur GFAP ciblant ainsi son expression dans les cellules gliales. Il est prévu d'étudier de nombreux paramètres sur ces animaux transgéniques, en particulier les réponses cellulaires au niveau du CNS, de l'endothélium et des cellules immunitaires. Ces animaux permettront en particulier une étude *in vivo* de l'intégrité physique de la BHE vis-à-vis de colorants ou de cellules immunitaires marquées. Des études comportementales sont également prévues. Si il s'avère que l'expression de l'enveloppe reproduit des symptômes neuro-dégénératifs tels que ceux observés dans la SEP, ces animaux pourraient permettre d'obtenir un nouveau modèle animal de la SEP plus proche des conditions physiopathologiques de la maladie par comparaison au modèle animal actuel qui consiste à immuniser des animaux avec un antigène myélinique [135]. De plus, la possibilité d'exprimer l'enveloppe de manière inductible devrait permettre d'observer les effets d'une inflammation lorsque celle-ci devient chronique.

Sur le plan des perspective thérapeutiques, on notera pour terminer que la capacité des anticorps monoclonaux à bloquer l'action de Env-ms qui a déjà été démontrée [34] et en partie reproduite dans notre étude, amène de nouvelles perspectives de traitements qui pourraient être curatifs plutôt que palliatifs comme c'est le cas actuellement. En effet certains des anticorps utilisés dans cette étude sont aujourd'hui testés en essais cliniques de phase 2. A l'issue de ces tests, cette approche ciblant les rétrovirus endogènes pourrait donc aboutir à des traitements nouveaux et serait la première à cibler une des causes de la pathologie plutôt que l'un de ses symptômes.

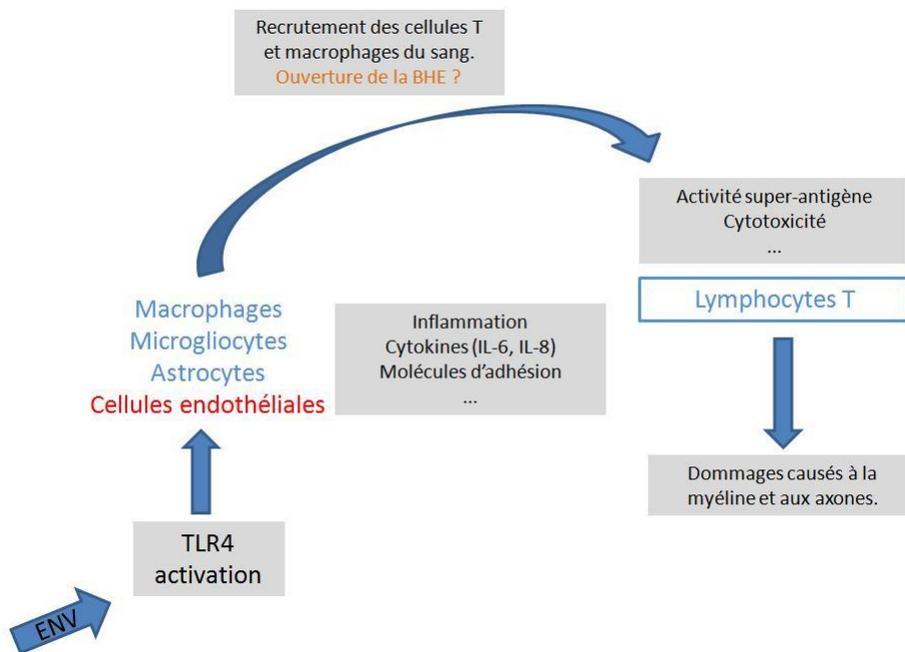
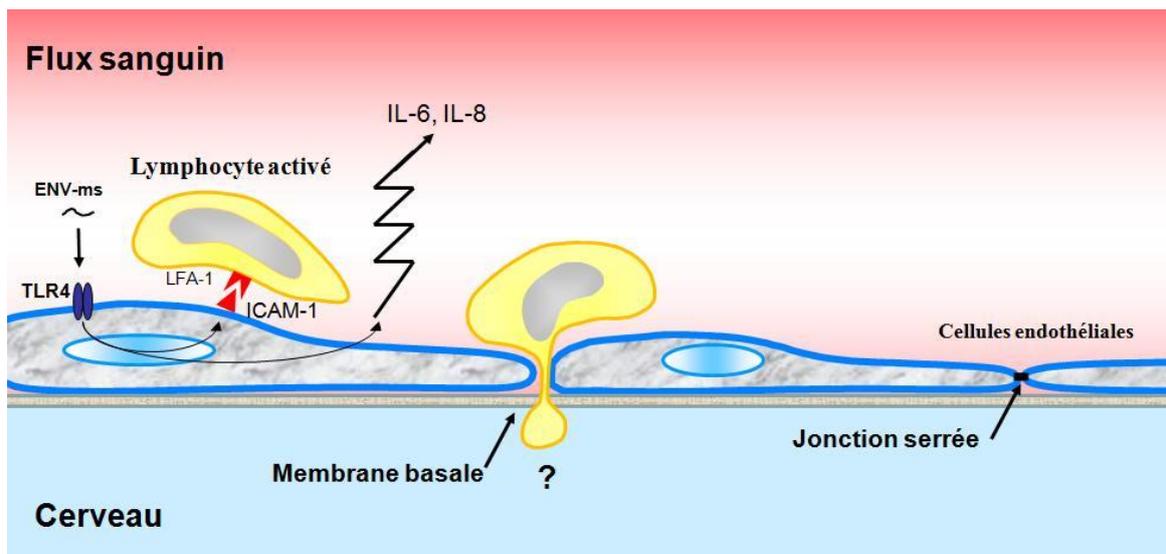


Figure 5.1. A : Représentation schématique de l'endothélium cérébral reprenant les principales conclusions de l'étude présentée dans ce manuscrit. Env-ms interagit avec le TLR4 exprimé par les cellules endothéliales, ce qui induit une surexpression d'ICAM-1 et une production de cytokines pro-inflammatoires. B : Conclusions de l'étude replacées dans le contexte du modèle proposé par H. Perron et al. (Figure originale présentée dans la partie 1.2.1)

Bibliographie

1. Weiss, R.A., *The discovery of endogenous retroviruses*. Retrovirology, 2006. **3**: p. 67.
2. Griffiths, D.J., *Endogenous retroviruses in the human genome sequence*. Genome Biol, 2001. **2**(6): p. REVIEWS1017.
3. Blond, J.L., F. Beseme, L. Duret, O. Bouton, F. Bedin, H. Perron, B. Mandrand, and F. Mallet, *Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family*. J Virol, 1999. **73**(2): p. 1175-85.
4. Frenco, J.L., D. Olivier, V. Cheynet, J.L. Blond, O. Bouton, M. Vidaud, M. Rabreau, D. Evain-Brion, and F. Mallet, *Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(10): p. 3566-74.
5. Cheynet, V., A. Ruggieri, G. Oriol, J.L. Blond, B. Boson, L. Vachot, B. Verrier, F.L. Cosset, and F. Mallet, *Synthesis, assembly, and processing of the Env ERVWE1/syncytin human endogenous retroviral envelope*. J Virol, 2005. **79**(9): p. 5585-93.
6. Mallet, F., O. Bouton, S. Prudhomme, V. Cheynet, G. Oriol, B. Bonnaud, G. Lucotte, L. Duret, and B. Mandrand, *The endogenous retroviral locus ERVWE1 is a bona fide gene involved in hominoid placental physiology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(6): p. 1731-6.
7. Blond, J.L., D. Lavillette, V. Cheynet, O. Bouton, G. Oriol, S. Chapel-Fernandes, B. Mandrand, F. Mallet, and F.L. Cosset, *An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor*. J Virol, 2000. **74**(7): p. 3321-9.
8. Mi, S., X. Lee, X. Li, G.M. Veldman, H. Finnerty, L. Racie, E. LaVallie, X.Y. Tang, P. Edouard, S. Howes, J.C. Keith, Jr., and J.M. McCoy, *Syncytin is a captive*

- retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis*. Nature, 2000. **403**(6771): p. 785-9.
9. Kim, H.S., O. Takenaka, and T.J. Crow, *Isolation and phylogeny of endogenous retrovirus sequences belonging to the HERV-W family in primates*. J Gen Virol, 1999. **80 (Pt 10)**: p. 2613-9.
 10. Perron, H., C. Bernard, J.B. Bertrand, A.B. Lang, I. Popa, K. Sanhadji, and J. Portoukalian, *Endogenous retroviral genes, Herpesviruses and gender in Multiple Sclerosis*. J Neurol Sci, 2009.
 11. Leboyer, M., R. Tamouza, D. Charron, R. Faucard, and H. Perron, *Human endogenous retrovirus type W (HERV-W) in schizophrenia: A new avenue of research at the gene-environment interface*. World J Biol Psychiatry, 2011.
 12. Perron, H., C. Geny, A. Laurent, C. Mouriquand, J. Pellat, J. Perret, and J.M. Seigneurin, *Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with reverse transcriptase activity and viral particles*. Res Virol, 1989. **140**(6): p. 551-61.
 13. Dolei, A., C. Serra, G. Mameli, M. Pugliatti, G. Sechi, M.C. Cirotto, G. Rosati, and S. Sotgiu, *Multiple sclerosis-associated retrovirus (MSRV) in Sardinian MS patients*. Neurology, 2002. **58**(3): p. 471-3.
 14. Mameli, G., V. Astone, G. Arru, S. Marconi, L. Lovato, C. Serra, S. Sotgiu, B. Bonetti, and A. Dolei, *Brains and peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis (MS) patients hyperexpress MS-associated retrovirus/HERV-W endogenous retrovirus, but not Human herpesvirus 6*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 1): p. 264-74.
 15. Perron, H., L. Mekaoui, C. Bernard, F. Veas, I. Stefas, and M. Leboyer, *Endogenous retrovirus type W GAG and envelope protein antigenemia in serum of schizophrenic patients*. Biol Psychiatry, 2008. **64**(12): p. 1019-23.
 16. Perron, H., R. Germi, C. Bernard, M. Garcia-Montojo, C. Deluen, L. Farinelli, R. Faucard, F. Veas, I. Stefas, B.O. Fabrick, J. Van-Horssen, P. Van-der-Valk, C. Gerdil, R. Mancuso, M. Saresella, M. Clerici, S. Marcel, A. Creange, R. Cavaretta, D. Caputo, G. Arru, P. Morand, A.B. Lang, S. Sotgiu, K. Ruprecht, P. Rieckmann, P. Villoslada, M. Chofflon, J. Boucraut, J. Pelletier, and H.P. Hartung, *Human endogenous*

- retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. Mult Scler*, 2012.
17. Perron, H., F. Lazarini, K. Ruprecht, C. Pechoux-Longin, D. Seilhean, V. Sazdovitch, A. Creange, N. Battail-Poirot, G. Sibai, L. Santoro, M. Jolivet, J.L. Darlix, P. Rieckmann, T. Arzberger, J.J. Hauw, and H. Lassmann, *Human endogenous retrovirus (HERV)-W ENV and GAG proteins: physiological expression in human brain and pathophysiological modulation in multiple sclerosis lesions. J Neurovirol*, 2005. **11**(1): p. 23-33.
 18. Yolken, R.H., H. Karlsson, F. Yee, N.L. Johnston-Wilson, and E.F. Torrey, *Endogenous retroviruses and schizophrenia. Brain Res Brain Res Rev*, 2000. **31**(2-3): p. 193-9.
 19. Perron, H., B. Lalande, B. Gratacap, A. Laurent, O. Genoulaz, C. Geny, M. Mallaret, E. Schuller, P. Stoebner, and J.M. Seigneurin, *Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis. Lancet*, 1991. **337**(8745): p. 862-3.
 20. Christensen, T., R.R. Tonjes, J. zur Megede, K. Boller, and A. Moller-Larsen, *Reverse transcriptase activity and particle production in B lymphoblastoid cell lines established from lymphocytes of patients with multiple sclerosis. AIDS Res Hum Retroviruses*, 1999. **15**(3): p. 285-91.
 21. Firouzi, R., A. Rolland, M. Michel, E. Jouvin-Marche, J.J. Hauw, C. Malcus-Vocanson, F. Lazarini, L. Gebuhrer, J.M. Seigneurin, J.L. Touraine, K. Sanhadji, P.N. Marche, and H. Perron, *Multiple sclerosis-associated retrovirus particles cause T lymphocyte-dependent death with brain hemorrhage in humanized SCID mice model. J Neurovirol*, 2003. **9**(1): p. 79-93.
 22. Garson, J.A., P.W. Tuke, P. Giraud, G. Paranhos-Baccala, and H. Perron, *Detection of virion-associated MSR-V-RNA in serum of patients with multiple sclerosis. Lancet*, 1998. **351**(9095): p. 33.
 23. Sotgiu, S., G. Arru, G. Mameli, C. Serra, M. Pugliatti, G. Rosati, and A. Dolei, *Multiple sclerosis-associated retrovirus in early multiple sclerosis: a six-year follow-up of a Sardinian cohort. Mult Scler*, 2006. **12**(6): p. 698-703.

24. Serra, C., S. Sotgiu, G. Mameli, M. Pugliatti, G. Rosati, and A. Dolei, *Multiple sclerosis and multiple sclerosis-associated retrovirus in Sardinia*. *Neurol Sci*, 2001. **22**(2): p. 171-3.
25. Zawada, M., I. Liwien, M. Pernak, D. Januszkiewicz-Lewandowska, K. Nowicka-Kujawska, J. Rembowska, K. Lewandowski, H. Hertmanowska, M. Wender, and J. Nowak, *MSRV pol sequence copy number as a potential marker of multiple sclerosis*. *Pol J Pharmacol*, 2003. **55**(5): p. 869-75.
26. Mameli, G., C. Serra, V. Astone, M. Castellazzi, L. Poddighe, E. Fainardi, W. Neri, E. Granieri, and A. Dolei, *Inhibition of multiple-sclerosis-associated retrovirus as biomarker of interferon therapy*. *J Neurovirol*, 2008. **14**(1): p. 73-7.
27. Komurian-Pradel, F., G. Paranhos-Baccala, F. Bedin, A. Ounanian-Paraz, M. Sodoyer, C. Ott, A. Rajoharison, E. Garcia, F. Mallet, B. Mandrand, and H. Perron, *Molecular cloning and characterization of MSRV-related sequences associated with retrovirus-like particles*. *Virology*, 1999. **260**(1): p. 1-9.
28. Perron, H., J.A. Garson, F. Bedin, F. Beseme, G. Paranhos-Baccala, F. Komurian-Pradel, F. Mallet, P.W. Tuke, C. Voisset, J.L. Blond, B. Lalande, J.M. Seigneurin, and B. Mandrand, *Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(14): p. 7583-8.
29. Brudek, T., P. Luhdorf, T. Christensen, H.J. Hansen, and A. Moller-Larsen, *Activation of endogenous retrovirus reverse transcriptase in multiple sclerosis patient lymphocytes by inactivated HSV-1, HHV-6 and VZV*. *J Neuroimmunol*, 2007. **187**(1-2): p. 147-55.
30. Ruprecht, K., K. Obojes, V. Wengel, F. Gronen, K.S. Kim, H. Perron, J. Schneider-Schaulies, and P. Rieckmann, *Regulation of human endogenous retrovirus W protein expression by herpes simplex virus type 1: implications for multiple sclerosis*. *J Neurovirol*, 2006. **12**(1): p. 65-71.
31. Sutkowski, N., B. Conrad, D.A. Thorley-Lawson, and B.T. Huber, *Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen*. *Immunity*, 2001. **15**(4): p. 579-89.

32. Perron, H., M. Suh, B. Lalande, B. Gratacap, A. Laurent, P. Stoebner, and J.M. Seigneurin, *Herpes simplex virus ICP0 and ICP4 immediate early proteins strongly enhance expression of a retrovirus harboured by a leptomeningeal cell line from a patient with multiple sclerosis*. J Gen Virol, 1993. **74 (Pt 1)**: p. 65-72.
33. Lafon, M., E. Jouvin-Marche, P.N. Marche, and H. Perron, *Human viral superantigens: to be or not to be transactivated?* Trends Immunol, 2002. **23(5)**: p. 238-9; author reply 239.
34. Rolland, A., E. Jouvin-Marche, C. Viret, M. Faure, H. Perron, and P.N. Marche, *The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses*. J Immunol, 2006. **176(12)**: p. 7636-44.
35. Brudek, T., T. Christensen, L. Aagaard, T. Petersen, H.J. Hansen, and A. Moller-Larsen, *B cells and monocytes from patients with active multiple sclerosis exhibit increased surface expression of both HERV-H Env and HERV-W Env, accompanied by increased seroreactivity*. Retrovirology, 2009. **6**: p. 104.
36. Rolland, A., E. Jouvin-Marche, M. Saresella, P. Ferrante, R. Cavaretta, A. Creange, P. Marche, and H. Perron, *Correlation between disease severity and in vitro cytokine production mediated by MSR/V (multiple sclerosis associated retroviral element) envelope protein in patients with multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2005. **160(1-2)**: p. 195-203.
37. Saresella, M., A. Rolland, I. Marventano, R. Cavaretta, D. Caputo, P. Marche, H. Perron, and M. Clerici, *Multiple sclerosis-associated retroviral agent (MSRV)-stimulated cytokine production in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis*. Mult Scler, 2009. **15(4)**: p. 443-7.
38. Dolei, A. and H. Perron, *The multiple sclerosis-associated retrovirus and its HERV-W endogenous family: a biological interface between virology, genetics, and immunology in human physiology and disease*. J Neurovirol, 2008: p. 1-10.
39. Pullen, A.M., T. Wade, P. Marrack, and J.W. Kappler, *Identification of the region of T cell receptor beta chain that interacts with the self-superantigen MIs-1a*. Cell, 1990. **61(7)**: p. 1365-74.

40. Cazenave, P.A., P.N. Marche, E. Jouvin-Marche, D. Voegtle, F. Bonhomme, A. Bandeira, and A. Coutinho, *V beta 17 gene polymorphism in wild-derived mouse strains: two amino acid substitutions in the V beta 17 region greatly alter T cell receptor specificity*. Cell, 1990. **63**(4): p. 717-28.
41. Dellabona, P., J. Peccoud, J. Kappler, P. Marrack, C. Benoist, and D. Mathis, *Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove*. Cell, 1990. **62**(6): p. 1115-21.
42. Herman, A., N. Labrecque, J. Thibodeau, P. Marrack, J.W. Kappler, and R.P. Sekaly, *Identification of the staphylococcal enterotoxin A superantigen binding site in the beta 1 domain of the human histocompatibility antigen HLA-DR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(22): p. 9954-8.
43. Kappler, J.W., N. Roehm, and P. Marrack, *T cell tolerance by clonal elimination in the thymus*. Cell, 1987. **49**(2): p. 273-80.
44. Goldsby, R., T. Kindt, B. Osborne, and J. Kuby, *Kuby Immunology*. 5th ed. 2002: WH Freeman & company.
45. Acha-Orbea, H. and H.R. MacDonald, *Superantigens of mouse mammary tumor virus*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 459-86.
46. Marrack, P., E. Kushnir, and J. Kappler, *A maternally inherited superantigen encoded by a mammary tumour virus*. Nature, 1991. **349**(6309): p. 524-6.
47. Choi, Y., J.W. Kappler, and P. Marrack, *A superantigen encoded in the open reading frame of the 3' long terminal repeat of mouse mammary tumour virus*. Nature, 1991. **350**(6315): p. 203-7.
48. Acha-Orbea, H., A.N. Shakhov, and D. Finke, *Immune response to MMTV infection*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 1594-609.
49. Held, W., G.A. Waanders, A.N. Shakhov, L. Scarpellino, H. Acha-Orbea, and H.R. MacDonald, *Superantigen-induced immune stimulation amplifies mouse mammary tumor virus infection and allows virus transmission*. Cell, 1993. **74**(3): p. 529-40.

50. Perron, H., E. Jouvin-Marche, M. Michel, A. Ounanian-Paraz, S. Camelo, A. Dumon, C. Jolivet-Reynaud, F. Marcel, Y. Souillet, E. Borel, L. Gebuhrer, L. Santoro, S. Marcel, J.M. Seigneurin, P.N. Marche, and M. Lafon, *Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation*. Virology, 2001. **287**(2): p. 321-32.
51. Dougier, H., C. Lomparski, C. Villiers, A. Duperray, C. Bernard, E. Jouvin-Marche, H. Perron, and P. Marche, *The envelope of human endogenous retrovirus in neuroinflammation*. Retrovirology, 2009. **6** (suppl 2): p. 53.
52. Steinman, L., *Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system*. Cell, 1996. **85**(3): p. 299-302.
53. Simon, K.C., K.L. Munger, and A. Ascherio, *Vitamin D and multiple sclerosis: epidemiology, immunology, and genetics*. Curr Opin Neurol, 2012. **25**(3): p. 246-51.
54. Santiago, O., J. Gutierrez, A. Sorlozano, J. de Dios Luna, E. Villegas, and O. Fernandez, *Relation between Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: analytic study of scientific production*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010. **29**(7): p. 857-66.
55. Krone, B. and J.M. Grange, *Paradigms in multiple sclerosis: time for a change, time for a unifying concept*. Inflammopharmacology, 2011. **19**(4): p. 187-95.
56. Fugger, L., M.A. Friese, and J.I. Bell, *From genes to function: the next challenge to understanding multiple sclerosis*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(6): p. 408-17.
57. Alcina, A., M. Fedetz, D. Ndagire, O. Fernandez, L. Leyva, M. Guerrero, M.M. Abad-Grau, C. Arnal, C. Delgado, M. Lucas, G. Izquierdo, and F. Matesanz, *IL2RA/CD25 gene polymorphisms: uneven association with multiple sclerosis (MS) and type 1 diabetes (T1D)*. PLoS One, 2009. **4**(1): p. e4137.
58. Gourraud, P.A., H.F. Harbo, S.L. Hauser, and S.E. Baranzini, *The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review*. Immunol Rev, 2012. **248**(1): p. 87-103.

59. Nellaker, C., Y. Yao, L. Jones-Brando, F. Mallet, R.H. Yolken, and H. Karlsson, *Transactivation of elements in the human endogenous retrovirus W family by viral infection*. *Retrovirology*, 2006. **3**: p. 44.
60. Mameli, G., L. Poddighe, A. Mei, E. Uleri, S. Sotgiu, C. Serra, R. Manetti, and A. Dolei, *Expression and activation by epstein barr virus of human endogenous retroviruses-w in blood cells and astrocytes: inference for multiple sclerosis*. *PLoS One*. **7**(9): p. e44991.
61. Antony, J.M., G. van Marle, W. Opii, D.A. Butterfield, F. Mallet, V.W. Yong, J.L. Wallace, R.M. Deacon, K. Warren, and C. Power, *Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination*. *Nat Neurosci*, 2004. **7**(10): p. 1088-95.
62. Lunemann, J.D., I. Jelcic, S. Roberts, A. Lutterotti, B. Tackenberg, R. Martin, and C. Munz, *EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2*. *J Exp Med*, 2008. **205**(8): p. 1763-73.
63. Lucas, R.M., A.M. Hughes, M.L. Lay, A.L. Ponsonby, D.E. Dwyer, B.V. Taylor, and M.P. Pender, *Epstein-Barr virus and multiple sclerosis*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. **82**(10): p. 1142-8.
64. Alvarez, J.I., R. Cayrol, and A. Prat, *Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1812**(2): p. 252-64.
65. McFarland, H.F. and R. Martin, *Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(9): p. 913-9.
66. Mendes, A. and M.J. Sa, *Classical immunomodulatory therapy in multiple sclerosis: how it acts, how it works*. *Arq Neuropsiquiatr*, 2011. **69**(3): p. 536-43.
67. Ryan, F.P., *Human endogenous retroviruses in multiple sclerosis: potential for novel neuro-pharmacological research*. *Curr Neuropharmacol*, 2011. **9**(2): p. 360-9.
68. Petzelbauer, P., T. Halama, and M. Groger, *Endothelial adherens junctions*. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 2000. **5**(1): p. 10-3.

69. Correale, J. and A. Villa, *The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting*. *Autoimmunity*, 2007. **40**(2): p. 148-60.
70. Wosik, K., R. Cayrol, A. Dodelet-Devillers, F. Berthelet, M. Bernard, R. Moundjian, A. Bouthillier, T.L. Reudelhuber, and A. Prat, *Angiotensin II controls occludin function and is required for blood brain barrier maintenance: relevance to multiple sclerosis*. *J Neurosci*, 2007. **27**(34): p. 9032-42.
71. Leech, S., J. Kirk, J. Plumb, and S. McQuaid, *Persistent endothelial abnormalities and blood-brain barrier leak in primary and secondary progressive multiple sclerosis*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2007. **33**(1): p. 86-98.
72. Hickey, W.F., *Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system*. *Glia*, 2001. **36**(2): p. 118-24.
73. Bednarczyk, J. and K. Lukasiuk, *Tight junctions in neurological diseases*. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2011. **71**(4): p. 393-408.
74. Janzer, R.C. and M.C. Raff, *Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells*. *Nature*, 1987. **325**(6101): p. 253-7.
75. Bush, T.G., N. Puvanachandra, C.H. Horner, A. Polito, T. Ostensfeld, C.N. Svendsen, L. Mucke, M.H. Johnson, and M.V. Sofroniew, *Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice*. *Neuron*, 1999. **23**(2): p. 297-308.
76. Armulik, A., G. Genove, M. Mae, M.H. Nisancioglu, E. Wallgard, C. Niaudet, L. He, J. Norlin, P. Lindblom, K. Strittmatter, B.R. Johansson, and C. Betsholtz, *Pericytes regulate the blood-brain barrier*. *Nature*, 2010. **468**(7323): p. 557-61.
77. Daneman, R., L. Zhou, A.A. Kebede, and B.A. Barres, *Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis*. *Nature*, 2010. **468**(7323): p. 562-6.
78. Butt, A.M., H.C. Jones, and N.J. Abbott, *Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study*. *J Physiol*, 1990. **429**: p. 47-62.

79. Wilhelm, I., C. Fazakas, and I.A. Krizbai, *In vitro models of the blood-brain barrier*. Acta Neurobiol Exp (Wars), 2011. **71**(1): p. 113-28.
80. Alexander, J.S., R. Zivadinov, A.H. Maghzi, V.C. Ganta, M.K. Harris, and A. Minagar, *Multiple sclerosis and cerebral endothelial dysfunction: Mechanisms*. Pathophysiology, 2010. **18**(1): p. 3-12.
81. Weksler, B.B., E.A. Subileau, N. Perriere, P. Charneau, K. Holloway, M. Leveque, H. Tricoire-Leignel, A. Nicotra, S. Bourdoulous, P. Turowski, D.K. Male, F. Roux, J. Greenwood, I.A. Romero, and P.O. Couraud, *Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line*. Faseb J, 2005. **19**(13): p. 1872-4.
82. Hatherell, K., P.O. Couraud, I.A. Romero, B. Weksler, and G.J. Pilkington, *Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models*. J Neurosci Methods, 2011. **199**(2): p. 223-9.
83. Mako, V., J. Czucz, Z. Weiszhar, E. Herczenik, J. Matko, Z. Prohaszka, and L. Cervenak, *Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1beta, TNF-alpha, and LPS*. Cytometry A, 2010. **77**(10): p. 962-70.
84. Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J.M. Reichhart, and J.A. Hoffmann, *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell, 1996. **86**(6): p. 973-83.
85. Trinchieri, G. and A. Sher, *Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(3): p. 179-90.
86. Nagyoszi, P., I. Wilhelm, A.E. Farkas, C. Fazakas, N.T. Dung, J. Hasko, and I.A. Krizbai, *Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells*. Neurochem Int, 2010.
87. Boehme, K.W. and T. Compton, *Innate sensing of viruses by toll-like receptors*. J Virol, 2004. **78**(15): p. 7867-73.

88. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
89. West, A.P., A.A. Koblansky, and S. Ghosh, *Recognition and signaling by toll-like receptors*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 409-37.
90. Burzyn, D., J.C. Rassa, D. Kim, I. Nepomnaschy, S.R. Ross, and I. Piazzon, *Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by a retrovirus*. J Virol, 2004. **78**(2): p. 576-84.
91. Kurt-Jones, E.A., L. Popova, L. Kwinn, L.M. Haynes, L.P. Jones, R.A. Tripp, E.E. Walsh, M.W. Freeman, D.T. Golenbock, L.J. Anderson, and R.W. Finberg, *Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 398-401.
92. Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M.Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler, *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
93. Qureshi, S.T., L. Lariviere, G. Leveque, S. Clermont, K.J. Moore, P. Gros, and D. Malo, *Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)*. J Exp Med, 1999. **189**(4): p. 615-25.
94. Park, B.S., D.H. Song, H.M. Kim, B.S. Choi, H. Lee, and J.O. Lee, *The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex*. Nature, 2009. **458**(7242): p. 1191-5.
95. Dunzendorfer, S., H.K. Lee, K. Soldau, and P.S. Tobias, *Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses*. Faseb J, 2004. **18**(10): p. 1117-9.
96. Frey, E.A., D.S. Miller, T.G. Jahr, A. Sundan, V. Bazil, T. Espevik, B.B. Finlay, and S.D. Wright, *Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide*. J Exp Med, 1992. **176**(6): p. 1665-71.

97. Cohen, L., A. Haziot, D.R. Shen, X.Y. Lin, C. Sia, R. Harper, J. Silver, and S.M. Goyert, *CD14-independent responses to LPS require a serum factor that is absent from neonates*. J Immunol, 1995. **155**(11): p. 5337-42.
98. Ohnishi, T., M. Muroi, and K. Tanamoto, *MD-2 is necessary for the toll-like receptor 4 protein to undergo glycosylation essential for its translocation to the cell surface*. Clin Diagn Lab Immunol, 2003. **10**(3): p. 405-10.
99. McGettrick, A.F. and L.A. O'Neill, *Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(1): p. 20-7.
100. Kagan, J.C., T. Su, T. Horng, A. Chow, S. Akira, and R. Medzhitov, *TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta*. Nat Immunol, 2008. **9**(4): p. 361-8.
101. Danese, S., E. Dejana, and C. Fiocchi, *Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation*. J Immunol, 2007. **178**(10): p. 6017-22.
102. Opitz, B., S. Hippenstiel, J. Eitel, and N. Suttorp, *Extra- and intracellular innate immune recognition in endothelial cells*. Thromb Haemost, 2007. **98**(2): p. 319-26.
103. Holman, D.W., R.S. Klein, and R.M. Ransohoff, *The blood-brain barrier, chemokines and multiple sclerosis*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1812**(2): p. 220-30.
104. Greenwood, J., S.J. Heasman, J.I. Alvarez, A. Prat, R. Lyck, and B. Engelhardt, *Review: leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2011. **37**(1): p. 24-39.
105. Hashimoto, K., N. Kataoka, E. Nakamura, K. Hagihara, M. Hatano, T. Okamoto, H. Kanouchi, Y. Minatogawa, S. Mohri, K. Tsujioka, and F. Kajiya, *Monocyte trans-endothelial migration augments subsequent transmigratory activity with increased PECAM-1 and decreased VE-cadherin at endothelial junctions*. Int J Cardiol, 2010.
106. Sorokin, L., *The impact of the extracellular matrix on inflammation*. Nat Rev Immunol. **10**(10): p. 712-23.

107. Agrawal, S., P. Anderson, M. Durbeej, N. van Rooijen, F. Ivars, G. Opdenakker, and L.M. Sorokin, *Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Exp Med, 2006. **203**(4): p. 1007-19.
108. Muller, W.A., *Mechanisms of leukocyte transendothelial migration*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 323-44.
109. Ley, K., C. Laudanna, M.I. Cybulsky, and S. Nourshargh, *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
110. Antony, J.M., Y. Zhu, M. Izad, K.G. Warren, M. Vodjgani, F. Mallet, and C. Power, *Comparative expression of human endogenous retrovirus-W genes in multiple sclerosis*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2007. **23**(10): p. 1251-6.
111. Deb-Rinker, P., T.A. Klempan, R.L. O'Reilly, E.F. Torrey, and S.M. Singh, *Molecular characterization of a MSRV-like sequence identified by RDA from monozygotic twin pairs discordant for schizophrenia*. Genomics, 1999. **61**(2): p. 133-44.
112. Antony, J.M., A.M. Deslauriers, R.K. Bhat, K.K. Ellestad, and C. Power, *Human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: Innocent bystanders or disease determinants?* Biochim Biophys Acta, 2011.
113. Jaffe, E.A., R.L. Nachman, C.G. Becker, and C.R. Minick, *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria*. J Clin Invest, 1973. **52**(11): p. 2745-56.
114. Duperray, A., L.R. Languino, J. Plescia, A. McDowall, N. Hogg, A.G. Craig, A.R. Berendt, and D.C. Altieri, *Molecular identification of a novel fibrinogen binding site on the first domain of ICAM-1 regulating leukocyte-endothelium bridging*. J Biol Chem, 1997. **272**(1): p. 435-41.
115. Cayrol, R., K. Wosik, J.L. Berard, A. Dodelet-Devillers, I. Ifergan, H. Kebir, A.S. Haqqani, K. Kreymborg, S. Krug, R. Moundjian, A. Bouthillier, B. Becher, N. Arbour, S. David, D. Stanimirovic, and A. Prat, *Activated leukocyte cell adhesion*

- molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system.* Nat Immunol, 2008. **9**(2): p. 137-45.
116. Andreakos, E., S.M. Sacre, C. Smith, A. Lundberg, S. Kiriakidis, T. Stonehouse, C. Monaco, M. Feldmann, and B.M. Foxwell, *Distinct pathways of LPS-induced NF-kappa B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP.* Blood, 2004. **103**(6): p. 2229-37.
 117. Hornef, M.W., T. Frisan, A. Vandewalle, S. Normark, and A. Richter-Dahlfors, *Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells.* J Exp Med, 2002. **195**(5): p. 559-70.
 118. Li, J., L. Ye, X. Wang, J. Liu, Y. Wang, Y. Zhou, and W. Ho, *(-)-Epigallocatechin gallate inhibits endotoxin-induced expression of inflammatory cytokines in human cerebral microvascular endothelial cells.* J Neuroinflammation, 2012. **9**(1): p. 161.
 119. Forster, C., M. Burek, I.A. Romero, B. Weksler, P.O. Couraud, and D. Drenckhahn, *Differential effects of hydrocortisone and TNFalpha on tight junction proteins in an in vitro model of the human blood-brain barrier.* J Physiol, 2008. **586**(7): p. 1937-49.
 120. Cohen-Kashi Malina, K., I. Cooper, and V.I. Teichberg, *Closing the gap between the in-vivo and in-vitro blood-brain barrier tightness.* Brain Res, 2009. **1284**: p. 12-21.
 121. Urich, E., S.E. Lazic, J. Molnos, I. Wells, and P.O. Freskgard, *Transcriptional profiling of human brain endothelial cells reveals key properties crucial for predictive in vitro blood-brain barrier models.* PLoS One, 2012. **7**(5): p. e38149.
 122. Crone, C. and S.P. Olesen, *Electrical resistance of brain microvascular endothelium.* Brain Res, 1982. **241**(1): p. 49-55.
 123. Coisne, C. and B. Engelhardt, *Tight junctions in brain barriers during central nervous system inflammation.* Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(5): p. 1285-303.
 124. Latz, E., A. Visintin, E. Lien, K.A. Fitzgerald, B.G. Monks, E.A. Kurt-Jones, D.T. Golenbock, and T. Espevik, *Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is*

- distinct from the initiation of signal transduction.* J Biol Chem, 2002. **277**(49): p. 47834-43.
125. Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, and M. Kimoto, *MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4.* J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1777-82.
 126. Kim, H.M., B.S. Park, J.I. Kim, S.E. Kim, J. Lee, S.C. Oh, P. Enkhbayar, N. Matsushima, H. Lee, O.J. Yoo, and J.O. Lee, *Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran.* Cell, 2007. **130**(5): p. 906-17.
 127. Held, W., H. Acha-Orbea, H.R. MacDonald, and G.A. Waanders, *Superantigens and retroviral infection: insights from mouse mammary tumor virus.* Immunol Today, 1994. **15**(4): p. 184-90.
 128. Giannina Arru, G.M., Vito Astone, Caterina Serra, Yu-Min Huang, Hans Link, Enrico Fainardi, Massimiliano Castellazzi, Enrico Granieri, Miriam Fernandez, Pablo Villoslada, Maria Laura Fois, Alessandra Sanna, Giulio Rosati, Antonina Dolei, Stefano Sotgiu, *Multiple Sclerosis and HERV-W/MSRV: A multicentric Study.* International journal of Biomedical science.
 129. Frank, O., M. Giehl, C. Zheng, R. Hehlmann, C. Leib-Mosch, and W. Seifarth, *Human endogenous retrovirus expression profiles in samples from brains of patients with schizophrenia and bipolar disorders.* J Virol, 2005. **79**(17): p. 10890-901.
 130. Karlsson, H., S. Bachmann, J. Schroder, J. McArthur, E.F. Torrey, and R.H. Yolken, *Retroviral RNA identified in the cerebrospinal fluids and brains of individuals with schizophrenia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(8): p. 4634-9.
 131. Karlsson, H., J. Schroder, S. Bachmann, C. Bottmer, and R.H. Yolken, *HERV-W-related RNA detected in plasma from individuals with recent-onset schizophrenia or schizoaffective disorder.* Mol Psychiatry, 2004. **9**(1): p. 12-3.
 132. Yao, Y., J. Schroder, C. Nellaker, C. Bottmer, S. Bachmann, R.H. Yolken, and H. Karlsson, *Elevated levels of human endogenous retrovirus-W transcripts in blood cells from patients with first episode schizophrenia.* Genes Brain Behav, 2008. **7**(1): p. 103-12.

133. Bhat, R.K., K.K. Ellestad, B.M. Wheatley, R. Warren, R.A. Holt, and C. Power, *Age- and disease-dependent HERV-W envelope allelic variation in brain: association with neuroimmune gene expression*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e19176.
134. Gaudin, P., S. Ijaz, P.W. Tuke, F. Marcel, A. Paraz, J.M. Seigneurin, B. Mandrand, H. Perron, and J.A. Garson, *Infrequency of detection of particle-associated MSR/HERV-W RNA in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2000. **39**(9): p. 950-4.
135. Bernard, C.C., T.G. Johns, A. Slavin, M. Ichikawa, C. Ewing, J. Liu, and J. Bettadapura, *Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis*. J Mol Med (Berl), 1997. **75**(2): p. 77-88.

Résumé :

Le MSRV (Multiple Sclerosis Associated Retro Virus) fait partie de la famille de rétrovirus endogènes humains HERV-W. Une protéine d'enveloppe provenant du MSRV est retrouvée chez la plupart des patients atteints de sclérose en plaque (SEP). Cette protéine (Env-ms) a des propriétés pro-inflammatoires sur les cellules immunitaires et pourrait donc jouer un rôle dans la pathogenèse de la SEP en exacerbant la diapédèse leucocytaire observée dans le système nerveux central (SNC) des patients. Cette étude vise principalement à analyser les effets de Env-ms sur la barrière hémato-encéphalique (BHE) au niveau moléculaire et fonctionnel.

Nous avons pu démontrer que l'enveloppe recombinante du MSRV était capable de stimuler plusieurs paramètres inflammatoires sur un modèle humain de BHE *in vitro*, la lignée HCMEC/D3. En effet, Env-ms induit une surexpression d'ICAM-1, une protéine impliquée dans l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales, d'une manière dose dépendante ainsi qu'une production dose dépendante de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et l'IL-8. De plus, par une approche utilisant des siRNAs, nous avons pu montrer que Env-ms était reconnue par le récepteur TLR4, un récepteur de l'immunité innée exprimé par les cellules endothéliales. Nous avons aussi montré par des essais fonctionnels que Env-ms stimulait de manière significative l'adhésion de cellules immunitaires activées à la monocouche de cellules endothéliales.

Enfin, nous avons aussi mesuré les effets de Env-ms sur des cultures primaires de cellules endothéliales HUVEC et nous avons pu montrer que les propriétés pro-inflammatoires de la protéine d'enveloppe étaient similaires à celles observées sur le modèle HCMEC/D3

Ces résultats appuient l'hypothèse selon laquelle le MSRV pourrait être impliqué dans la pathogenèse de la SEP ou bien dans le maintien d'un niveau d'inflammation élevé favorisant le désordre immunitaire observé chez les patients. Le MSRV pourrait également jouer un rôle dans d'autres maladies inflammatoires chroniques.

Mots clés : MSRV, sclérose en plaques, barrière hémato encéphalique, inflammation.

Abstract:

The MSRV (Multiple Sclerosis Associated Retro Virus) belongs to the human endogenous retrovirus HERV-W family. An envelope protein originating from the MSRV was found in most patients with multiple sclerosis (MS). This protein (Env-ms) has pro-inflammatory properties on several immune cells and could therefore play a role in the MS pathogenesis by promoting the leukocyte diapedesis observed in the central nervous system of patients. Our study aims to analyze the effects of Env-ms on the blood-brain barrier (BBB) at a molecular and functional level.

We have demonstrated that the recombinant MSRV envelope was able to strongly stimulate several inflammatory parameters on a human BBB *in vitro* model, the HCMEC/D3 cell line. Indeed, Env-ms induced overexpression of ICAM-1, a major mediator of leukocyte adhesion to endothelial cells, in a dose-dependent manner and a strong dose-dependent production of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8. Furthermore, using a silencing approach with siRNAs, we have shown that Env-ms was recognized via the TLR4 receptor, a pattern recognition receptor of innate immunity present on endothelial cells. Indeed, the knock down of TLR4 abolishes the pro-inflammatory effects of Env-ms. We have also shown using functional assays, that the treatment of brain endothelial cells with Env-ms significantly stimulated the adhesion of activated immune cells to the monolayer of endothelial cells.

We also assessed the effects of Env-ms on primary endothelial cells HUVECs and we observed that the pro-inflammatory properties of the envelope protein were similar to those observed on HCMEC/D3.

These findings support the hypothesis that MSRV could be involved in the pathogenesis of MS disease or at least in maintenance of inflammatory conditions thus fueling the auto-immune disorder. The MSRV could also play a role in other chronic inflammatory diseases

Key words: MSRV, multiple sclerosis, blood brain barrier, inflammation.