



Mise en évidence de l'interaction de la protéine tat du VIH-1 avec les pentraxines humaines : Impact sur la transcription du VIH et la différenciation des cellules dendritiques

Ulrick Mavoungou Bigouagou

► To cite this version:

Ulrick Mavoungou Bigouagou. Mise en évidence de l'interaction de la protéine tat du VIH-1 avec les pentraxines humaines : Impact sur la transcription du VIH et la différenciation des cellules dendritiques. Immunologie. Université d'Angers, 2010. Français. NNT: . tel-00580867

HAL Id: tel-00580867

<https://theses.hal.science/tel-00580867>

Submitted on 29 Mar 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**MISE EN ÉVIDENCE DE L'INTERACTION DE LA PROTÉINE TAT
DU VIH-1 AVEC LES PENTRAXINES HUMAINES : IMPACT SUR LA
TRANSCRIPTION DU VIH ET LA DIFFÉRENCIATION DES
CELLULES DENDRITIQUES**

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité: Immunologie

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ Nantes/Angers

Présentée et soutenue publiquement

le : 12 novembre 2010

à : ANGERS

Par : Ulrick MAVOUNGOU BIGOUAGOU

Devant le jury ci-dessous:

Pr Alain MOREL (<i>Président du jury</i>)	Professeur, Centre régional de lutte contre le cancer Paul PAPIN d'Angers, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, France
Dr Jean-Claude SIRARD (<i>Rapporteur</i>)	Chargé de Recherche, Inserm U1019, Institut PASTEUR, Lille, France
Dr Michel LÉONETTI (<i>Rapporteur</i>)	Chercheur, Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA), Gif – Sur – Yvette, France
Pr Pascale JEANNIN (<i>Examineur</i>)	Praticien Hospitalier – Professeur d'Université, Inserm U892, CHU d'Angers, France
Dr Yves DELNESTE (<i>Directeur de thèse</i>)	Directeur de Recherche, Inserm U892, CHU d'Angers, France

INSERM U892, Équipe 15
CHU ANGERS
4 rue Larrey
Bât Montclair, 2è étage
49933 ANGERS CEDEX

ED (N°) 502

À toi **AGNÈS**, ma maman chérie,

Remerciements

J'exprime mes sincères remerciements aux membres du jury pour l'évaluation de mon travail de thèse

Merci au Professeur Alain MOREL d'avoir honoré ce travail en acceptant de présider le jury et pour ses précieux conseils lors du choix de mon parcours en Master 2. Merci aux Docteurs Jean-Claude SIRARD et Michel LÉONETTI d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Merci au Professeur Pascale JEANNIN d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse

Je remercie particulièrement le Docteur Michel LÉONETTI pour son apport intellectuel au cours ma thèse. J'ai vraiment apprécié la collaboration et les discussions autour de nos thématiques de recherche. Merci du chaleureux accueil à chaque fois que je me rendais au CEA. Il était très bon le « rouge » de notre première rencontre dans un des resto du CEA. Cela m'est resté graver, car ce fut mon premier déjeuner de travail.

Je tiens particulièrement à exprimer mes profonds remerciements au Professeur Pascale JEANNIN de la confiance qu'elle m'a faite en me recrutant pour le stage de Master 2 et d'avoir contribué de façon prépondérante à l'encadrement et à la réussite de ma thèse. J'ai particulièrement apprécié ton discernement scientifique, ta rigueur, ta franchise et ta simplicité. J'ai beaucoup appris à tes côtés tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Je suis fier de faire partie de la liste de nombreux doctorants qui bénéficieront de ton encadrement.

Tous mes hommages au Docteur Yves DELNESTE. Patron, Chef, merci d'avoir accepté de diriger mes travaux de thèse. J'ai profondément apprécié la liberté de travail que tu m'as accordée. Merci pour la pertinence de tes analyses scientifiques lors de nos discussions ou l'analyse des résultats. Merci pour ton aide précieuse dans la correction de

ce manuscrit. Merci pour ta bonne humeur et d'avoir supporté quelques fois mes « blagues gabonaises ». Merci pour ta simplicité et ta disponibilité même lorsque les conditions ne s'y prêtaient pas forcément. Merci pour toutes les valeurs que tu m'as transmises et d'avoir accepté de conduire mes premiers pas de jeune chercheur. Tu resteras un modèle d'humilité pour moi. Je n'oublierai jamais ta participation, avec Pascale, à la course organisée pour la récolte des fonds au profit des malades du Centre Paul PAPIN. Je suis profondément persuadé que notre collaboration se poursuivra.

J'exprime mes sincères remerciements au Professeur Dominique COUEZ pour sa contribution intellectuelle dans le projet de recherche que j'ai développé pendant ma thèse. Merci pour ta simplicité.

J'exprime toute ma reconnaissance au Docteur Christophe GUILLON qui a bien voulu m'initier à la biologie du VIH et aux secrets de la protéine Tat. Merci pour ton soutien intellectuel et pour ton aide dans la correction de ce manuscrit.

J'exprime mes sincères remerciements et ma reconnaissance à l'ensemble de l'équipe 15 YD de l'US92 avec laquelle j'ai effectué mes travaux de thèse. Merci à toutes et à tous de votre chaleureux accueil lors de mon arrivée au laboratoire (mamie doit encore se rappeler de l'entretien avec Pascale un certain 19 août 2005 ; c'était cool, enfin c'était sympa). Merci pour votre bonne humeur qui contribue à la bonne ambiance au sein de l'équipe. Céline (mamie), merci pour ta douceur et tes précieux conseils. J'espère que tu n'auras plus à me prêter tes béquilles. Et encore toutes mes félicitations pour ton poste de MCU-PH, ainsi que pour ton dernier « Blood ». Dorothee (DD), merci de ta participation à mon initiation aux techniques d'Immuno ; j'espère que maintenant tu t'es habituée au chapeau et aux bottes des texans. Erwan (Wawanga), merci de ton aide et ta bonne humeur même lorsqu'il n'y a pas d'éthanol dans les parages, fais en usage avec modération même si tu es un petit breton (kenavo). Fang, allez un peu de courage c'est bientôt fini. Je suis ravi de t'avoir rencontré, même si moi qui suis passionné de langue n'ai rien appris du chinois (yo osomachi véma ?), je te souhaite une bonne continuation. Henry, je dirai que je suis très heureux de t'avoir rencontré, surtout pour nos discussions intellectuelles parfois

interminables, refroidissant même quelques fois nos repas. Je te souhaite une bonne santé en santé (surtout n'oublie pas que tu as une thèse de science à finir). Isa, je sais qu'en France ceci pourrait paraître déplacé, mais je t'ai toujours considérée comme ma petite sœur, même si tu fais quelques centimètres de plus que moi. Merci de ton aide précieuse dans les techniques de bio mol et pour la petite Léya, elle est très belle. Julien « Leblack », merci de ta bonne humeur et ta spontanéité, je suis vraiment content de t'avoir rencontré. J'ai déprimé un peu après ton départ du labo, car je n'avais plus personne sur qui me défouler. Mari, « pleine de grâce », heureux de t'avoir rencontrée et merci pour ta promptitude. Je te souhaite une bonne continuation. Murielle, « the witch », je n'oublierais jamais nos discussions sur la semence et la fécondation (toi seule peut comprendre). Merci de ton apport dans mon initiation à la biologie des lymphocytes T et de m'avoir supporté pendant 4 ans. Je te souhaite une bonne continuation. Pierre (Cunnnnnnnnnnn, nnnnnnnnnnn), il a fallu attendre le 21st century pour qu'il soit autorisé à un gabonais et à un vosgien de se rencontrer. J'ai vraiment apprécié tous les moments passés ensemble (bonne gourmandise !!!). Seb, merci pour tout ce que tu m'as apporté tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Tu resteras le maître du western blotting. Au fait, l'OM est bien parti pour rempiler. J'espère que je passerai te voir à Milan d'ici là. Simon, merci de m'avoir initié aux techniques de bio cell et surtout pour ta disponibilité. Je suis heureux d'avoir fait ta connaissance et te souhaite une bonne continuation au sein de la team. Yveline, (78), je suis content car tu as de plus en plus confiance en toi. Je suis heureux de t'avoir rencontré et te souhaite une bonne continuation pour ta thèse. Ulrich, je suis heureux de t'avoir connu et te souhaite une bonne continuation pour ta thèse. Sabrina, heureux de t'avoir rencontrée ; je te souhaite une passionnante et longue carrière d'enseignant-chercheur. Laurent, je te dis courage pour la fin de ta thèse et bonne chance pour la suite.

Aux filles (Sabine, Laëticia, Linda, Laurence, Catherine, Zaza), merci d'avoir participé, par votre bonne humeur, à la réussite de ma thèse. Je suis heureux de vous avoir rencontrées.

Fabien et François, merci à vous deux pour votre bonne humeur. Je suis très heureux de vous avoir connus.

À Marc et David, j'exprime mon amitié. Marc, j'espère qu'on aura enfin le temps d'aller siffler de bonnes bières en pleine mer au cours de bonnes parties de pêche. J'espère surtout que tu viendras me rendre visite au Gabon et profiter un peu des côtes inexplorées en pêche. David, je resterai ton ami tant que tu prendras soin de mamie, VIVE L'OM. J'espère que L'OM m'aura fait le bonheur de détrôner Rennes juste avant ma soutenance.

À mes secrétaires préférées (Patrícia, Léna, Céline et Prêscília), sans vous je ne m'en serais jamais sorti pour toutes les questions administratives. Merci de votre disponibilité. À Patrícia et Prêscília, merci particulièrement de m'avoir aidé pour la reliure de mon manuscrit de thèse.

À tous mes ami(e)s qui ont cru en ma capacité et qui n'ont cessé de me soutenir, j'adresse tous mes amicaux et sympathiques remerciements. Merci de votre soutien et surtout de votre précieuse présence. Merci à Céline et Guillaume de m'avoir fait cadeau de l'ordinateur portable pour la rédaction de mon manuscrit de thèse. Merci aussi du soutien que vous avez toujours été pour moi dans les temps difficiles. Gros bisous à toi Bryan.

À toi, Emmanuela, ma filleule qui m'a tant apporté. Merci d'avoir participé à la réussite des 2 dernières années de ma thèse. Tu étais et resteras mon soleil quotidien. Chacun de tes séjours à la maison étaient pour moi de grosses bouffées d'oxygène. Nos conversations téléphoniques, quoique brèves, m'ont toujours fait beaucoup de bien; même si celles-ci seront plus longues dans quelques années. Je t'aime très fort.

À la merveilleuse famille spirituelle de « 5 rue de Bretagne », merci de tout le soutien et l'amour que tu m'as témoigné pendant ma thèse. Je suis particulièrement reconnaissant à Stêphanie et Patrick pour leur précieux soutien financier au début de ma thèse. Merci infiniment à celui qui a permis cette gracieuse rencontre.

Enfin, j'exprime toute ma reconnaissance à l'ensemble des membres de ma famille. Agnès (ma maman chérie), je te dédie cette thèse, comme le fruit de ta persévérance, merci

d'avoir toujours cru en mes capacités. À toi Maurice, mon papa, même si tu n'es plus de ce monde ton amour ne m'a jamais quitté, je te dédie cette thèse. À mes quatre sœurs aînées (maman José, madame GRO sans S, Ma ngoudi et Line), merci de la confiance et l'amour que vous m'avez toujours portés. Merci de votre soutien financier. À mes deux frères aînés (Lacrise et Antonio), merci de m'avoir pris en charge après la mort de notre père. Je vous dédie ce travail comme symbole de ma reconnaissance. Merci de votre soutien financier et d'avoir toujours cru en mes capacités. À mes neveux et nièces, j'exprime toute ma tendresse. Vous êtes ma motivation et mon soleil quotidien. Je vous aime très fort et espère vous retrouver bientôt pour fêter ensemble ce sésame.

,

ABBREVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BPCO	Broncho-pneumopathie chronique obstructive
CARD	« Caspase Recruitment Domain »
cDC	« Conventiønnal DC »
CLR	« C-type lectin receptors »
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	Cytomegalovirus
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CRD	"Carbohydrate Recognition Domain"
CRF	"Circulating Recombinant Forms"
CRP	"C Reactive Protein"
CTL	"Cytotoxic T lymphocyte"
DAMP	"Damage-Associated Molecular Pattern"
DC	"Dendritic Cell"
DC-SIGN	"DC-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin"
DTP	Domaine de transduction protéique
DTT	Dithiothreitol
ECP	"Eosinophil cationic protein"
e.g	exempli gratia
EPO	"Eosinophil peroxidase"
FGF	"Fibroblast Growth Factor"
G-CSF	"Granulocyte-Colony Stimulating Factor"
GM-CSF	"Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor"
HAART	"Highly Active AntiRetroviral Therapy"
HAD	"HIV-Associated Dementia"
HAT	"Histone acetyltransferases"
HLA	"Human Leukocyte Antigen"
HPV	"Human PapillomaVirus"
HSV	"Herpes Simplex Virus"
HTLV	"Human T-lymphotropic virus"
ICAM	"IntraCellular Adhesion molecule"
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IRAK	"Interleukin-1 receptor-associated kinase"
IPS-1	"IFN β -promoter stimulator 1"
IRF	"IFN regulating factor"
kDa	KiloDalton
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LDL	"Low Density Lipoprotein"
LPS	LipoPolySaccharide
LTR	"Long Terminal Repeat"
MBL	"Mannose Binding Lectin"
MBP	"Mannose Binding Protein"

MIP	“Macrophage Inflammatory Protein”
NF-κB	“Nuclear Factor-kappa B”
NK	“Natural killer”
NLR	“NOD like recptors”
nM	nanoMolaire
PAMP	“Pathogen-Associated Molecular Pattern”
PCAF	“P300/CBP-Associated Factor”
pDC	“Plasmacytoïd DC”
PIC	“Pre-integration complex”
PKR	“Protein Kinase dsRNA-dependent”
PNN	Polynucléaires neutrophiles
PRR	“Pattern Recognition Receptors”
PTX	Pentraxine
PTX3	Pentraxine 3
RLH	“RIG like helicases”
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	“Reactive oxygen species”
RT	Rétrotranscriptase
SAP	“Serum Amyloïd P”
SIDA	Syndrome de l’immunodéficience acquise
SOCS	« Suppressor of cytokine signalling »
SR	“Scavenger Receptors”
TAR	“Trans-acting Responsive element”
TCR	“T cell receptor”
TIR	“Toll/interleukin-1 receptor”
Th	“T helper”
TLR	“Toll like receptors”
TSG	“TNF-stimulating gene”
µg/ml	microgramme par millilitre
VACV	“Vaccinia virus”
VCAM	“Vascular cell adhesion molecule »
VEGF	“Vascular Endothelial Growth Factor”
VHC	Virus de l’hépatite C
VIH	Virus de l’immunodéficience humaine
VIS	Virus de l’immunodéficience simienne

SOMMAIRE

INTRODUCTION	p1
1- Composantes cellulaire et moléculaire de l'immunité innée	p3
1-1) Les cellules de l'immunité innée	p3
1-1-1) Les monocytes/macrophages	p4
1-1-2) Les cellules dendritiques (ou DC)	p6
1-2) Les récepteurs de l'immunité innée	p9
1-2-1) Les PRR associés aux cellules	p11
1-2-1-1) Les PRR d'endocytose	p11
1-2-1-1-1) Les « Scavenger Receptors » ou SR	p11
1-2-1-1-2) Les lectines de type-C	p12
1-2-1-2) Les PRR de signalisation	p14
1-2-1-2-1) Les TLRs	p14
1-2-1-2-2) Les NLRs	p16
1-2-1-2-3) Les RLHs	p18
1-2-2) Les PRR solubles	p19
1-2-2-1) Les collectines et les ficolines	p19
1-2-2-2) Les pentraxines	p23
1-2-2-2-1) Les pentraxines courtes	p24
1-2-2-2-2) Les pentraxines longues	p29
2- Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)	p32
2-1) Histoire du VIH	p32
2-1-1) Origine simienne du VIH	p33
2-1-2) Modes de transmission	p34
2-1-3) Variabilité du VIH : classification et nomenclature	p35
2-2) Structure du VIH	p37
2-2-1) Protéines de structure	p37

2-2-2) Le génome du VIH	p38
2-2-3) Protéines enzymatiques	p40
2-2-3) Protéines de régulation et accessoires	p40
2-3) Le cycle de réplication viral	p42
2-4) Immunopathologie de l'infection à VIH	p44
2-4-1) La phase de primo-infection	p44
2-4-2) La phase chronique (ou asymptomatique)	p45
2-4-3) La phase SIDA	p49
3- La protéine Tat du VIH	p51
3-1) Gène et structure protéique	p51
3-1-1) Structure primaire	p51
3-1-2) Structure secondaire	p53
3-1-3) Structure tertiaire	p53
3-1-4) Structure quaternaire	p55
3-2) La protéine Tat intracellulaire	p57
3-2-1) Rôle de Tat dans la transcription du génome viral	p57
3-3) La protéine Tat extracellulaire	p60
3-3-1) Reconnaissance de la molécule Tat extracellulaire	p60
3-3-2) Internalisation de Tat extracellulaire	p61
3-3-2-1) Internalisation médiée par un récepteur	p61
3-3-2-2) Internalisation par translocation membranaire	p61
3-3-3) Propriétés immunomodulatrices de Tat	p62
3-3-4) Effets de Tat sur le système nerveux central	p63
3-3-5) Rôle de Tat dans l'activation de virus non apparentés au VIH	p64
3-3-6) Rôle de Tat dans le développement des cancers associés au SIDA	p65
3-3-7) Tat comme cible vaccinale et/ou thérapeutique	p65
OBJECTIFS	p67
MANUSCRIT 1	p69

Introduction	p69
Principaux résultats	p70
Manuscrit soumis	p72
EVALUATION DE L'IMPACT DE TAT ET DES COMPLEXES TAT/PENTRAXINES SUR LA DIFFERENCIATION DES CELLULES DENDRITIQUES	p99
Introduction	p99
Résultats préliminaires	p100
MANUSCRIT 2	p106
Introduction	p106
Principaux résultats	p108
Manuscrit en préparation	p110
DISCUSSION	p128
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p136
ANNEXE	p157

INTRODUCTION

Le système immunitaire permet à l'organisme de se défendre contre une multitude de pathogènes et les mécanismes physiologiques mis en œuvre pour établir une réponse immune protectrice ne sont pas encore complètement élucidés. La réponse immune peut être schématiquement divisée en deux composantes : un volet inné ou naturel et un volet adaptatif ou acquis.

L'immunité innée constitue la première ligne de défense immunitaire et n'est pas spécifique du microorganisme [1]. Les cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée sont essentiellement les polynucléaires neutrophiles-éosinophiles et basophiles, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules « natural killer ». Les épithéliums jouent également un rôle fondamental de première barrière du système immunitaire inné contre les microorganismes. Cette immunité comprend également des médiateurs solubles qui interviennent dans la destruction et l'élimination des microbes. La reconnaissance des microorganismes par les cellules de l'immunité innée s'effectue via des récepteurs appelés *Pattern Recognition Receptors* (PRR). Les PRR ont été sélectionnés au cours de l'évolution pour leur capacité à reconnaître des motifs hautement conservés à travers les genres et essentiels à la survie des microorganismes. Ces motifs microbiens sont appelés *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMP) ; citons, à titre d'exemple, l'acide lipotéchoïque et le lipopolysaccharide, respectivement composants majeurs de la paroi des bactéries Gram+ et Gram-. Les PRR sont classés en deux familles : les PRR associés aux cellules et les PRR solubles.

Les PRR sont exprimés par de nombreux types cellulaires, immunitaires et non immunitaires, et permettent à ces cellules d'être rapidement activées lors d'un contact avec un microorganisme, sans éducation préalable. La réponse immunitaire innée ne développerait pas de mémoire vis-à-vis des microbes et serait donc de nature et d'intensité identiques lors des différentes rencontres de l'organisme avec le même pathogène. L'immunité naturelle n'est cependant pas toujours suffisante pour éradiquer le pathogène mais elle est indispensable pour mener à bien une première défense avant que l'immunité adaptative ne prenne le relais. L'immunité innée possède un rôle de sentinelle associé à un rôle d'induction d'une réponse immunitaire adaptative spécifique d'un pathogène.

Le développement d'une immunité adaptative implique les lymphocytes T et les lymphocytes B qui sont les cellules support de la spécificité antigénique. Les cellules T CD4⁺ favorisent et orientent la génération de la réponse immune, principalement via la production de cytokines. Les cellules T CD8⁺ ont une activité cytolytique et éliminent les cellules étrangères, les cellules tumorales ou les cellules infectées par un virus ou un parasite intracellulaire. Les lymphocytes B secrètent des anticorps spécifiques d'antigènes, qui servent également de sentinelles en captant les protéines solubles circulantes et en opsonisant les microbes. La réponse immune adaptative est associée à l'expansion clonale de lymphocytes B et T exprimant des récepteurs spécifiques (respectivement TCR et Ig) pour les antigènes cibles. Ces récepteurs sont exprimés de manière clonale et la diversité du répertoire est générée par réarrangement somatique. Les lymphocytes spécifiques d'antigènes sont sélectionnés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Parmi les CPA, les cellules dendritiques (dendritic cells ou DC) jouent un rôle essentiel dans l'initiation d'une réponse adaptative spécifique, car ce sont les CPA les plus efficaces pour activer des lymphocytes T naïfs [2]. Les antigènes capturés par les DC sont présentés dans les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II, respectivement aux lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Les molécules de costimulation (principalement les molécules de la famille B7) exprimées par les DC fournissent un signal de costimulation aux lymphocytes T, nécessaire à leur activation [2, 3]. Une présentation antigénique en l'absence de signal de costimulation conduit à un état d'anergie ou de tolérance. Les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ correctement activés se différencient en lymphocytes T effecteurs, respectivement T auxiliaires et T cytotoxiques.

La détection de virus ou des composants viraux par les cellules de l'immunité innée implique des PRR solubles et des PRR associés aux cellules. La reconnaissance virale peut avoir des conséquences opposées, à savoir une réponse protectrice ou un échappement à la pression immunitaire.

Dans la première partie de l'introduction, nous nous intéresserons essentiellement aux acteurs cellulaires et moléculaires de la réponse immunitaire innée, puis dans un second temps nous ferons quelques rappels sur le VIH avant de nous intéresser plus en détail à une des composantes majeures du VIH-1, la protéine Tat, qui sera particulièrement l'objet de nos travaux.

1- Composantes cellulaire et moléculaire de l'immunité innée

1-1) Les cellules de l'immunité innée

Dès l'entrée d'un pathogène dans un organisme, des molécules et des cellules spécialisées appartenant au système immunitaire inné vont être engagées. La composante cellulaire implique les épithéliums, les polynucléaires neutrophiles (PNN), les polynucléaires éosinophiles, les polynucléaires basophiles, les mastocytes, les cellules « natural killer » (NK), les macrophages et les cellules dendritiques. Les macrophages et les DC sont des cellules présentatrices d'antigènes, se situant ainsi à l'interface entre immunité innée et immunité adaptative. Les monocytes, les macrophages et les neutrophiles sont les phagocytes les plus efficaces possédant des PRR membranaires capables de fixer des molécules exprimées à la surface des bactéries tels que le LPS, le mannose et les acides teichoïques. Outre les neutrophiles et les macrophages, les éosinophiles sont peu actifs en termes de phagocytose mais produisent surtout des molécules oxydantes stockées dans leurs granules. Les cellules NK sont de grands lymphocytes granuleux, représentant jusqu'à 10% des lymphocytes sanguins chez l'adulte. Ces cellules forment notamment une première ligne de défense contre les infections virales et sont activées par des cytokines pro-inflammatoires (e.g. $\text{IFN}\alpha$, IL-2). La destruction d'une cellule par les cellules NK via la libération de granules lytiques contenant des médiateurs cytotoxiques tels que perforine et granzyme, dépend de la balance de signaux activateurs ou inhibiteurs que la cellule NK reçoit. Les cellules NK sont inhibées par la reconnaissance des molécules du CMH de classe I (CMH-I) et activées par des molécules exprimées ou surexprimées lors d'un stress cellulaire [4]. Le rôle des cellules de l'immunité est résumé dans la figure 1. Dans cette partie nous limiterons essentiellement notre description aux monocytes/macrophages et cellules dendritiques.

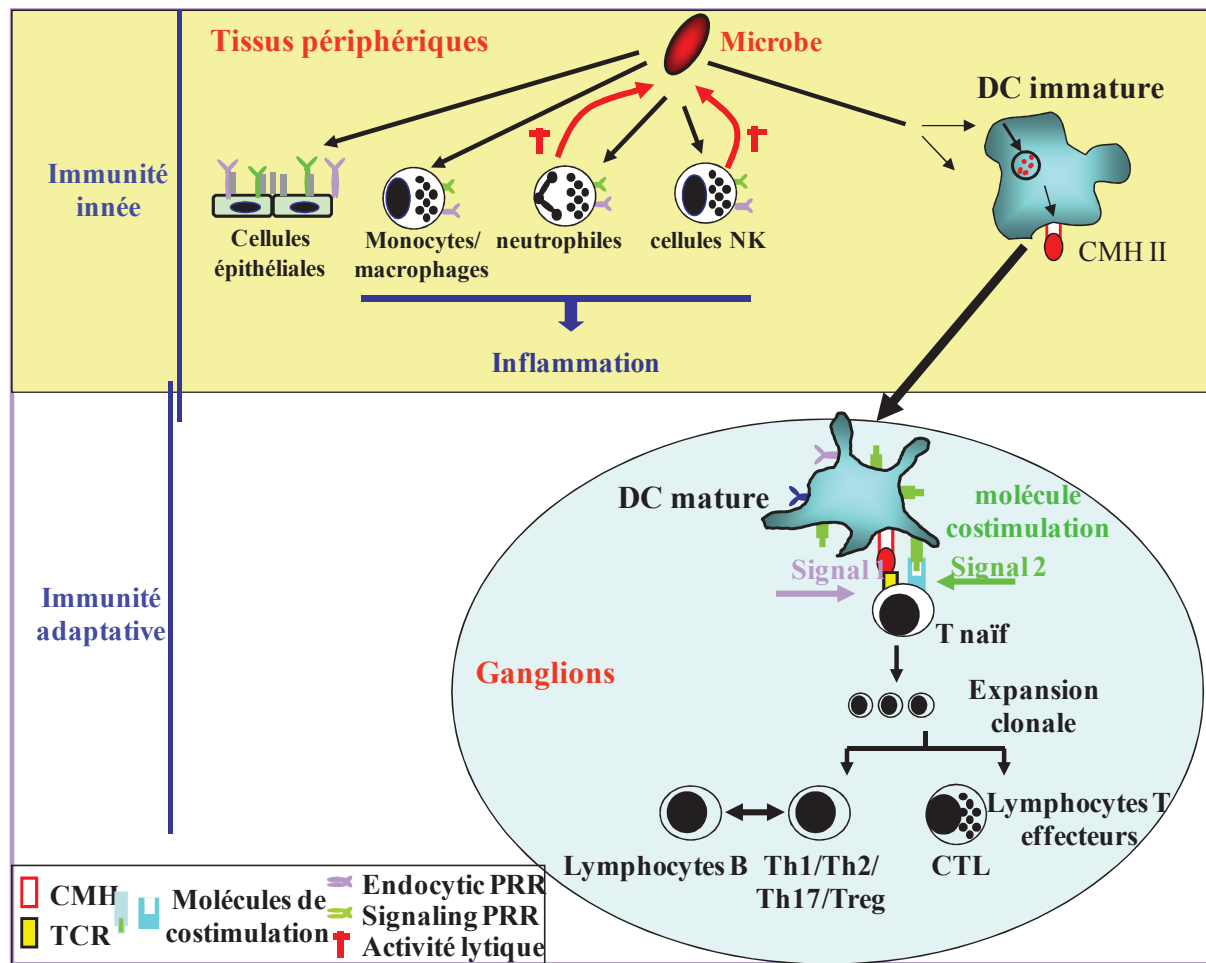


Figure 1 : Représentation schématique simplifiée du rôle des cellules de l'immunité innée
(Adaptée d'après [5])

1-1-1) Les monocytes/macrophages

Les monocytes du sang périphérique sont morphologiquement hétérogènes. En effet, ils présentent une variabilité de taille, de granularité et de forme du noyau. Avant de rejoindre la circulation sanguine, les monocytes sont issus des cellules progénitrices myéloïdes CD34⁺ de la moelle osseuse. Initialement, les monocytes ont été décrits pour leur expression très élevée du récepteur CD14, qui participe à la reconnaissance du LPS. Les monocytes circulent dans le sang, la moelle osseuse et la rate, et ne prolifèrent pas dans un état stable [6, 7]. Les monocytes sont des cellules effectrices équipées de récepteurs aux chimiokines et d'adhésion qui leur permettent de migrer du sang vers les tissus au cours de l'infection/inflammation. Ils produisent des cytokines inflammatoires et absorbent les cellules et molécules toxiques.

Au cours de l'inflammation, les monocytes sont capables de se différencier en DC ou en macrophages. La migration des monocytes vers les tissus, ainsi que leur différenciation en DC ou en macrophages, sont probablement déterminées par le milieu inflammatoire et les PRR engagés [8]. L'expression différentielle des marqueurs antigéniques par les monocytes permet de distinguer les sous populations selon leurs activités physiologiques aussi bien chez l'homme que chez la souris. Ainsi, chez l'homme, l'expression de CD14 et CD16 (ou FcγRIII) par les monocytes permet leur classification en deux sous-populations principales : les cellules CD14^{hi}CD16⁻, souvent appelés monocytes classiques du fait de leur phénotype correspondant à la description d'origine des monocytes, et les cellules CD14⁺CD16⁺ [9]. Les monocytes CD14⁺CD16⁺ expriment des quantités plus élevées des molécules du CMH II et de CD32 (ou FcγRII), phénotype semblable à celui des macrophages tissulaires matures [10]. Les deux sous-populations de monocytes présentent également des profils d'expression des récepteurs aux chimiokines différents. A titre d'exemple, la population CD14⁺CD16⁺ exprime CCR5, alors que la population CD14^{hi}CD16⁻ exprime CCR2 [11]. Certaines études de migration trans-endothéliale ont montré que les monocytes se différencient surtout en macrophages et très peu en DC. Cependant, dans ce modèle, la population de monocytes CD14⁺CD16⁺ serait plus susceptible de se différencier en DC. Ces monocytes seraient des précurseurs des DC qui migrent jusqu'aux ganglions lymphatiques via les vaisseaux lymphatiques afférents [12, 13].

Il faut noter que, outre chez l'homme, l'hétérogénéité des monocytes est également retrouvée chez d'autres mammifères tels que le rat (sous populations CD43^{low} et CD43^{hi}) [14, 15], le porc (sous populations CD163⁻ et CD163⁺) [16, 17] et la souris (sous populations CCR2⁺CX3CR1^{low} et CCR2⁻CX3CR1^{hi}) [18-22] avec une classification basée sur des marqueurs discriminants différents.

Les macrophages jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie tissulaire à travers la clairance des cellules sénescents et apoptotiques, ainsi que le remodelage et la réparation des tissus après inflammation [23, 24], et la production des facteurs de croissance. De façon générale, les macrophages sont issus de la différenciation des monocytes circulants et sont caractérisés par un haut degré d'hétérogénéité [25-27]. L'hétérogénéité reflète la spécialisation de fonction qui est adoptée par les macrophages dans différents emplacements anatomiques, y compris le remodelage osseux par les ostéoclastes et la forte expression de PRR par les macrophages alvéolaires [28-30]. Les PRR sont impliqués dans la clairance des microorganismes, de virus et des particules de l'environnement pulmonaire, ainsi que le

positionnement des macrophages thymiques [31]. Les macrophages sont également impliqués dans la clairance des cellules apoptotiques. L'intestin est l'une des plus importantes sources de macrophages de l'organisme qui sont caractérisés par une forte activité de phagocytose et bactéricide, et par une faible production des cytokines pro-inflammatoires. Ce phénotype peut être induit dans les macrophages dérivés du sang périphérique par les produits de la cellule stromale intestinale, indiquant que le microenvironnement tissulaire joue un rôle important dans l'acquisition du phénotype des macrophages résidents [32]. Il faut noter que l'hétérogénéité des macrophages peut être observée au sein d'un même organe, tel que la rate chez la souris

1-1-2) Les cellules dendritiques (ou DC)

Deux types de DC existent : les DC classiques (ou cDC) et les DC plasmacytoïdes (ou pDC). Les DC sont issues des progéniteurs $CD34^+$ de la moëlle osseuse [33] de laquelle elles sont libérées pour atteindre les tissus périphérique et lymphoïde via la circulation sanguine [34-36]. Il faut noter que les monocytes se développent à partir des mêmes cellules progénitrices myéloïdes, et sous certaines conditions, se différencient en cDC [12, 37]. Les cDC sont spécialisées dans la capture et la présentation antigéniques (l'engagement des DC dans la capture et la présentation antigéniques, ainsi que leur rôle dans la polarisation de la réponse immunitaire sont représentés dans les figures 1&3). Elles sont dotées d'une activité de phagocytose dans leur état immature et d'une forte capacité productrice de cytokines lorsqu'elles sont matures [38, 39]. Bien que présentes dans la circulation chez l'homme, les cDC sont plus rares dans le sang de la souris. Les cDC sont des cellules hautement migratrices, capables de se déplacer du tissu aux organes lymphoïdes hébergeant les cellules T et B. Les cDC régulent les réponses cellulaires T à l'état stable et au cours de l'infection. Elles ont généralement une courte demi-vie et sont remplacées par les précurseurs hématogènes [40, 41]. Les cDC sont différentes des cellules de Langerhans du tissu épidermique qui ne peuvent être renouvelées à l'état stable [42]. Les populations de cellules myéloïdes, en particulier, peuvent partager les caractéristiques des DC et macrophages, et leur discrimination peut s'avérer difficile.

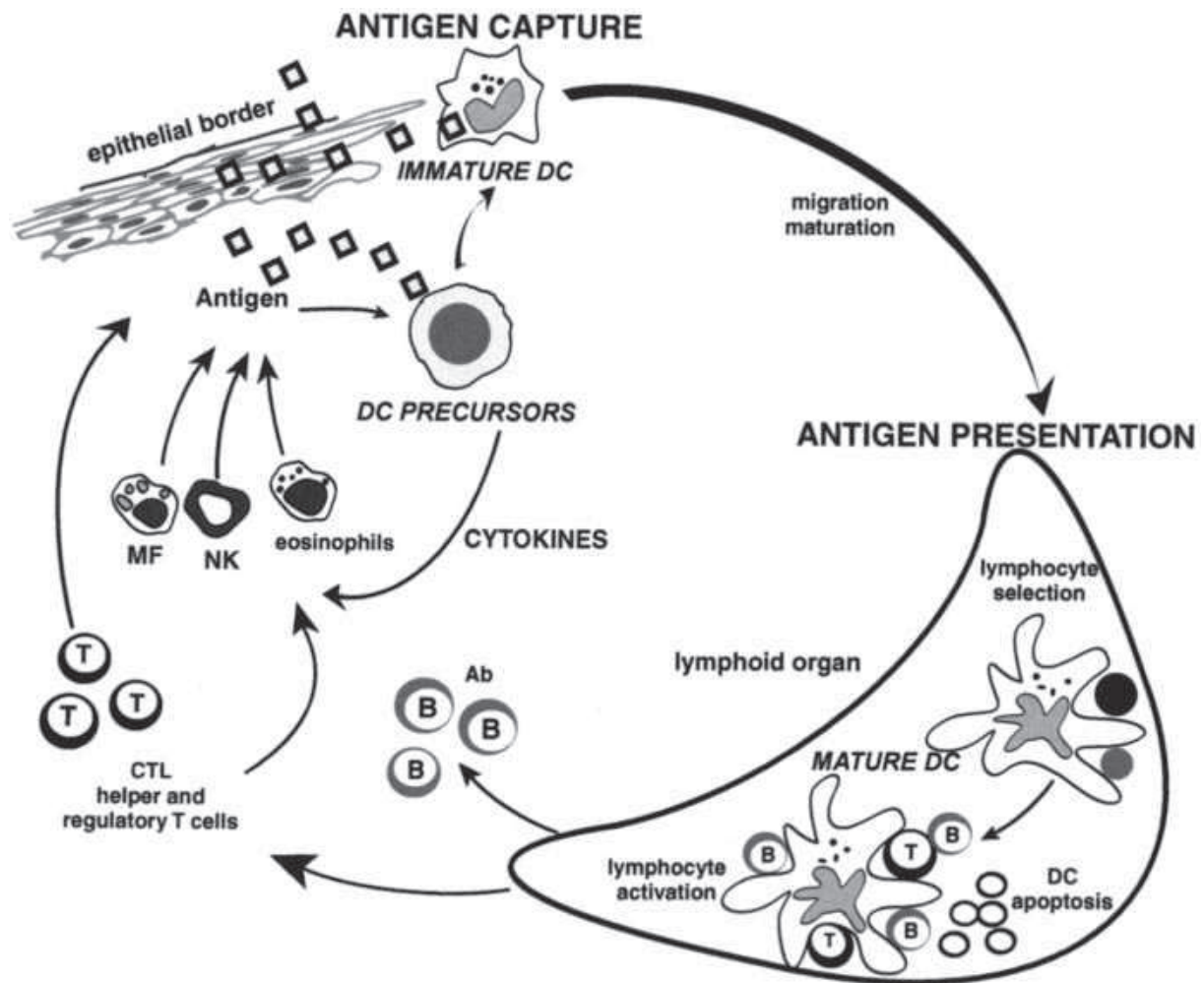


Figure 3 : Représentation simplifiée du rôle des DC dans la capture et la présentation antigéniques. Les DC sont également impliquées dans la polarisation de la réponse immunitaire (D'après [2])

Les pDC diffèrent des cDC par leur demi-vie plus longue et une proportion d'entre-elles qui porte des réarrangements caractéristiques des immunoglobulines [43]. Les pDC sont présentes dans la moelle osseuse et tous les organes périphériques. Contrairement aux cDC, les pDC sont spécialisées dans la réponse aux infections virales grâce à leur capacité à produire les IFN de type I. Les pDC sont également de puissantes cellules présentatrices d'antigènes, et participent au contrôle des réponses cellulaires T [44]. Elles sont donc impliquées à la fois dans l'initiation des réponses immunitaires innée et acquise [45].

Les DC se situent ainsi à l'interface des deux immunités innée et adaptative. Les propriétés immunomodulatrices des DC résident dans leur capacité de migration et de patrouille, des tissus périphériques aux organes lymphoïdes secondaires, où elles présentent

les antigènes aux cellules T naïves et déclenchent le développement des réponses immunitaires.

Les DC résident sous forme immature dans les tissus non lymphoïdes et, comme telles, sont hautement adaptées à la capture antigénique via des mécanismes médiés ou non par un récepteur. En effet, la capture antigénique et l'activation par des cytokines pro-inflammatoires induisent des changements phénotypiques et fonctionnels des DC immatures, conduisant ainsi à leur maturation. Les DC immatures expriment des récepteurs aux chimiokines inflammatoires, tels que CCR2, CCR5 et CXCR1, qui permettent leur migration au niveau des sites inflammatoires [46]. Une fois, au niveau de ces sites, les DC matures produisent et libèrent des médiateurs solubles, tels que les cytokines, qui vont participer à l'orientation de la réponse immunitaire adaptative.

1-2) Les Récepteurs de l'Immunité Innée (PRR)

Les PRR permettent aux cellules de l'immunité innée d'analyser l'environnement et de discriminer le soi du non-soi [47].

En 1999, Charles Janeway a émis l'hypothèse que les mécanismes de défense innée sont déclenchés par des récepteurs capables de reconnaître des motifs conservés présents uniquement chez les pathogènes et absents des cellules de l'hôte. Ces motifs, appelés PAMPs, constituent donc de véritables signatures moléculaires des microbes. Parmi les PAMPs, citons les peptidoglycanes, les mannanes, les lipopolysaccharides ainsi que l'ARN double brin viral et l'ADN bactérien. Les récepteurs capables de reconnaître les PAMPs sont appelés PRR. Les principaux PRR sont présentés dans le tableau 1.

L'engagement des récepteurs de l'immunité innée aboutit à différents types de réponses : phagocytose, activation (illustrée principalement par l'induction de molécules qui influencent la nature des réponses immunes adaptatives telles que des cytokines et des molécules de costimulation) et migration (ex : le récepteur f-Met-Leu-Phe impliqué dans la migration des neutrophiles).

Familles de protéines	Expression	Exemples	Exemples de Ligands	Exemples de Fonctions connues
C-type lectin Humoral	Plasma	Collectines	Carbohydrates des bactéries et des virus	Opsonisation, activation du complément
C-type lectin Cellulaire	Macrophages DC	Macrophage C-type lectins	Récepteur GalNAc	
	Macrophage DC	Mannose receptor	Mannose terminal	Phagocytose
Protéines riche en Leucine	Macrophage, cellules épithéliales	CD14	LPS	Signalisation
	Monocytes, Macrophages, DC	Récepteurs assimilés à la famille des TOLL (TLR)	Grande diversité (LPS, RNA, Pam Cys 3,...)	Signalisation
Récepteurs d'épuration	Macrophage	Macrophage Scavenger receptor	Paroi bactérienne	Phagocytose
Pentraxines	Plasma	C-reactive protein	Phosphatidyl choline	Opsonisation, activation du complément
		PTX3	Certains microorganismes, cellules apoptotiques,	Augmente la phagocytose, activation du complément
Integrines	Macrophage, DC, cellule NK, LT, Neutrophile...	CD11b/CD18, CD11c/CD18	LPS	Phagocytose, signalisation
Lipides transférases	Plasma	LBP (LPS binding protein)	LPS	Co-récepteur du LPS

Tableau 1 : Exemples de PRRs exprimés par les cellules du système immunitaire inné

Les PRR impliqués dans la reconnaissance immunitaire innée sont divisés en deux grandes familles sur la base de leur localisation : les PRR associés aux cellules et les PRR solubles.

1-2-1) Les PRRs associés aux cellules

Les récepteurs de l'immunité innée associés aux cellules sont classés en deux sous-classes selon leurs fonctions d'endocytose ou de signalisation. Le concept actuel suggère que l'internalisation d'un microorganisme par les récepteurs d'endocytose en l'absence d'une activation via les récepteurs de signalisation oriente le système immunitaire vers le développement d'une anergie ou d'une réponse de type tolérogène [48].

1-2-1-1) Les PRR d'endocytose.

La détection de pathogènes par l'immunité innée implique la mobilisation des PRR qui reconnaissent des motifs microbiens conservés au cours de l'évolution appelés « pathogen associated molecular patterns » (ou PAMPs), ou les marqueurs du soi modifié désignés « damage associated molecular patterns » (ou DAMPs) [49]. Les PRR d'endocytose regroupent plusieurs familles de molécules, essentiellement les récepteurs au complément, des intégrines, les récepteurs « éboueurs » (scavenger receptors ou SR) [47, 50] et la famille des lectines de type-C (C-type lectin receptors ou CLR) [51]. Ces récepteurs, ayant une forte activité d'endocytose, permettent l'internalisation des microorganismes qui sont, de façon générale, détruits dans les lysosomes. Les déterminants de ces microorganismes peuvent également être présentés par les CPA aux lymphocytes via les molécules du CMH de classe I et de classe II.

1-2-1-1-1) Les « scavenger receptors » (ou SR)

Les SR sont des glycoprotéines de surface décrits pour fixer les « low-density lipoprotein » (LDL) modifiés tels que les LDL oxydés (Ox-LDL) et les LDL acétylés (Ac-LDL) mais pas les LDL natifs [47]. Ces récepteurs sont fortement exprimés par les macrophages et induisent la formation de cellules riches en lipides constituant les plaques d'athérome. Les SRs ont la capacité de reconnaître un large panel de ligands tels que des microorganismes, des cellules apoptotiques et des composants de la matrice extracellulaire (e.g. collagène). Les SRs sont principalement exprimés par les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules dendritiques. La reconnaissance d'un ligand est suivie de son

internalisation et/ou de sa destruction [52]. Sur la base de leur structure moléculaire, les SRs sont divisés en huit classes (classe A à H) (cf. Figure 4)

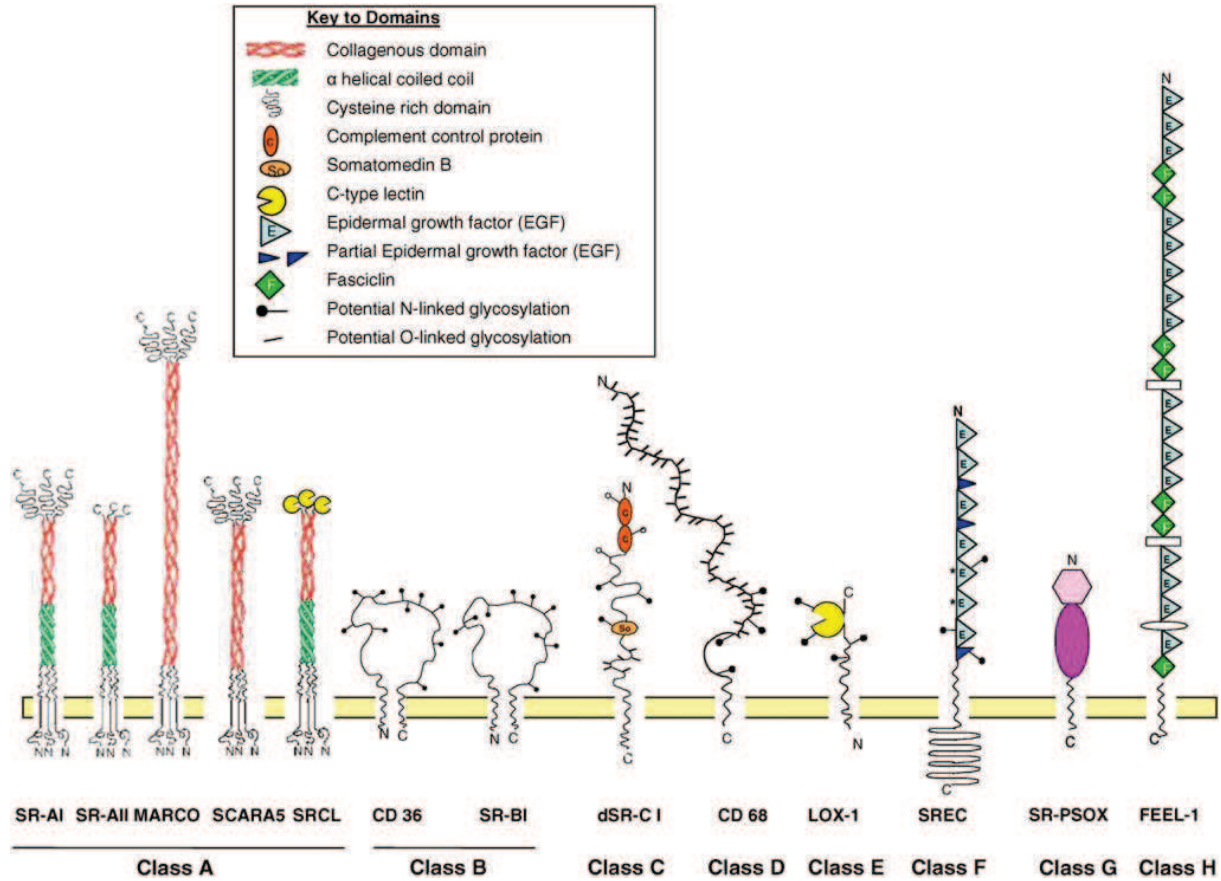


Figure 4 : Structure des différentes classes de SR. Les récepteurs sont regroupés en classes en fonction de leur homologie structurale. Les classes, notées de A à H, présentent des différences structurales entre elles (D'après [53]).

L'expression de l'ensemble de ces « scavenger receptors » peut-être régulée par des facteurs environnementaux tels que des cytokines ou des composants microbiens. Les SR jouent un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et dans l'immunité innée.

1-2-1-1-2) Les lectines de type-C

Les lectines de type-C constituent une grande famille de protéines exclusivement retrouvées chez les métazoaires. La désignation lectines de type-C dénote une protéine qui

reconnaît des structures carbohydrates de manière dépendante du calcium. Cependant, cette définition est mal adaptée puisque certains membres de cette famille ont un mécanisme de fixation indépendant du calcium (e.g. Dectin-1) [54]. Selon Robinson et collègues, toute protéine contenant un domaine lectine de type-C appartient à cette famille [54], ce domaine étant un motif structural possédant la capacité de reconnaître des carbohydrates. En plus de leur capacité d'endocytose, ces PRRs possèdent des propriétés de signalisation [54].

Les CLR sont constitués de protéines solubles (e.g. les collectines), opsonisant les microorganismes, et de protéines associées aux cellules participant à l'endocytose des microorganismes et à la signalisation intracellulaire.

A titre d'exemple pour cette famille, le récepteur DC-SIGN/CD209 (dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non integrin), exprimé par les cellules dendritiques et les macrophages alvéolaires et placentaires [55], est une protéine membranaire de type II qui reconnaît le mannose de manière dépendante du calcium [56] et, par leur structure mannosylée, le soi (e.g. MAC-1, ICAM) et le non soi (e.g. le virus de l'immunodéficience humaine ou VIH) [56]. Ce récepteur est impliqué dans la reconnaissance d'un grand nombre de pathogènes tels que *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Leishmania mexicana*, *Schistosoma mansoni*, *Candida albicans* et *Klebsiella pneumoniae* [57]. De plus, DC-SIGN forme des tétramères permettant une forte affinité pour les glycoprotéines et une forte interaction avec le VIH [58].

Le rôle de DC-SIGN dans la défense de certaines infections virales reste controversé. En effet, lors d'une infection par le VIH ou par le virus de l'hépatite C (VHC), DC-SIGN serait une voie de protection du virus et d'infection « en trans » des cellules voisines (e.g. lymphocytes T, hépatocytes) [51]. Cependant, des travaux récents montrant que DC-SIGN induit une internalisation du VIH permettant la destruction de la majeure partie des virions et la présentation de peptides viraux associés au CMH-I [59]. Il est ainsi probable que l'ensemble des virions n'est pas détruit et qu'une petite partie induit une infection en *trans* des lymphocytes T. De plus, l'interaction du VIH avec DC-SIGN exprimé par les DC inhibe (i) la production d'IL-12, (ii) la formation de dendrites caractéristiques de la maturation des DC et (iii) la capacité des DC activées à induire la prolifération des lymphocytes T [60]. A l'inverse, l'interaction du VIH avec DC-SIGN induit la production de chimiokines (e.g. CCL3, CCL5) attirant les lymphocytes T CD4⁺ qui sont les principales cibles du virus [60]. Ainsi, la reconnaissance du VIH par DC-SIGN apporterait un environnement favorable au virus en inhibant la maturation des DC et en permettant la propagation du virus dans les lymphocytes T [60].

DC-SIGN interagit avec *Mycobacterium tuberculosis* par la reconnaissance de lipoarabinomannane mannosylé (ManLAM) localisé dans la paroi de ce pathogène [61]. Le ManLAM est également sécrété par les macrophages infectés par *Mycobacterium tuberculosis* et induit une importante sécrétion d'IL-10 par les DC activées et inhibe leur maturation (inhibition de l'expression des facteurs de costimulation et du CMH-II) induite par le BCG [61]. *Mycobacterium tuberculosis* empreinte ainsi la « voie DC-SIGN » pour inhiber le système immunitaire et permettre sa prolifération.

1-2-1-2) Les PRR de signalisation.

Un groupe important de PRR de signalisation est impliqué dans la reconnaissance, du non-soi, en permettant d'induire la production des molécules effectrices de l'immunité innée. Ces PRR de signalisation peuvent être divisés en trois classes majeures : Les récepteurs de la famille Toll (Toll-like receptors ou TLR), les récepteurs de la famille NOD (NOD-like receptors ou NLR) et les récepteurs de la famille RIG (RIG-like helicases ou RLH) [62].

1-2-1-2-1) Les TLRs

Les TLRs sont des protéines de signalisation transmembranaires qui sont élaborées pour reconnaître, avec une haute affinité, une variété de lipides, de protéines, de carbohydrates et d'acides nucléiques de microorganismes. Les TLRs sont soit membranaires (TLR1,2,4,5,6) [63-65] soit intracellulaires (TLR3,7,8,9) [66, 67]. Le premier membre de la famille, nommé Toll, a été identifié chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) et intervient dans la mise en place de l'axe dorsoventral durant le développement embryonnaire [68]. A ce jour, 13 molécules TLRs sont retrouvées chez les mammifères : 10 chez l'homme (TLR1-10) et 12 chez la souris (TLR1-9 et TLR11-13). Les TLRs sont caractérisés par un domaine riche en leucine (LRR) couplé à un domaine proche de celui du récepteur à l'IL-1, nommé TIR (« Toll/IL-1 receptor ») [69]. Le domaine LRR permet la reconnaissance de PAMPs (bactéries, parasites, champignons, virus). A ce jour, un ligand a été identifié pour la plupart des TLRs exprimés chez l'homme (cf. Tableau 2).

De nombreux travaux ont porté sur l'étude du rôle des TLRs dans l'activation des cellules du système immunitaire. Les TLRs sont exprimés par de nombreux types cellulaires et sont impliqués dans de nombreux processus d'activation des cellules du système

immunitaire inné tels que (i) l'activation des cellules dendritiques (augmentation de l'expression des molécules de costimulation, production de cytokines pro-inflammatoires) [5], (ii) l'activation des cellules NK notamment par TLR2 et TLR5 (production de défensines, et de cytokines immunostimulatrices (IL-6, IFN γ)) [70], (iii) l'activation des éosinophiles, la stimulation par le R-848 (resiquimod hydrochloride) qui est un composé synthétique agoniste de TLR7 et TLR8, induit la survie des éosinophiles et la génération de composés superoxydes [71], (iv) l'activation des PNNs et (v) l'activation des basophiles [72-75]. De plus, les molécules TLRs sont également exprimées par les cellules épithéliales et leur activation induit la production de cytokines pro-inflammatoires. Cependant, ces cellules épithéliales seraient hyporéactives aux stimulations par les ligands des TLRs afin d'éviter un phénomène de superactivation et pour maintenir l'homéostasie tissulaire (tractus digestif ou respiratoire) [5].

Les TLRs ont également une action sur les cellules de l'immunité adaptative et notamment les lymphocytes T. En effet, les ligands de TLR2, TLR5 et TLR7/8, en association avec un anticorps anti-CD3 ou l'IL-2, activent les lymphocytes T CD4⁺ par une potentialisation de leur prolifération et de leur production de cytokines [76] (e.g IFN γ).

L'activation via les TLRs induit l'expression de nombreux gènes codant pour des cytokines, des chimiokines et des médiateurs de l'inflammation [77]. De plus, ils induisent des réponses antimicrobiennes via l'expression de peptides antimicrobiens ou la synthèse de monoxyde d'azote [78]. Les TLRs activent ainsi des cascades de signalisation dans les cellules, pouvant déclencher des réponses immunitaires et inflammatoires afin de combattre l'agent infectieux [1, 79, 80]. En effet, au cours de l'infection, des CPA, tels que les DC et les macrophages, expriment des TLRs qui reconnaissent des PAMPs, permettant ainsi la stimulation des défenses de l'hôte. Les TLRs initient également l'immunité adaptative via (i) l'activation des CPA qui produisent des cytokines pro-inflammatoires et expriment des molécules de costimulation et (ii) la maturation et la migration des DC [2] vers les ganglions lymphatiques drainants [81]. Chez l'homme et la souris, le trafic cellulaire est médié par les récepteurs aux chimiokines exprimés par les DC suite à la stimulation des TLRs [82-84]. Une fois dans les organes lymphoïdes secondaires, les DC stimulent les cellules T par la présentation des peptides associés aux molécules du CMH, en combinaison avec un signal secondaire délivré par les molécules de costimulation, tels que CD80 et CD86, essentielles à l'initiation des réponses immunitaires adaptatives. De façon concomitante, les DC produisent une variété de chimiokines nécessaires au recrutement des cellules NK et cellules T naïves. Dans les modèles murins, l'infection bactérienne active les DC via la stimulation des TLRs.

Cette stimulation induit préférentiellement des cytokines de type Th1, telle que l'IL-12. Après la reconnaissance d'un ligand, deux molécules TLR s'homodimérisent ou s'hétérodimérisent afin d'initier une cascade de signalisation aboutissant à l'induction d'une réponse pro-inflammatoire [85]. Deux voies de signalisation sont initiées par les TLRs. La première est une voie dépendante de MyD88, aboutissant à l'activation du facteur de transcription NF- κ B, et la deuxième est une voie indépendante de MyD88, aboutissant à la sécrétion d'interférons de type I.

TLRs	Agonistes microbiens
TLR1/TLR2 TLR2	Triacyl lipopeptides (bactéries, mycobactéries) Lipoprotéines acide lipotéichoïque (bactéries Gram positif) Lipoarabinomannan (mycobactérie) OmpA (bactéries Gram négatif) Porine (bactéries Gram négatif)
TLR3 TLR4	ARN double brin (virus) LPS (bactéries Gram négatif) Protéines virales (virus respiratoire syncytial) phosphatidylinositol mannosides (mycobactéries)
TLR5 TLR6/TLR2	Flagelline (bactéries à flagelle) Diacyl lipopeptides (mycoplasme)
TLR7 TLR8	ARN simple brin (virus) ARN simple brin (virus)
TLR9	ADN hypométhylé (bactéries), ADN viral
TLR10	Ligand non-connu

Tableau 2 : Agonistes des molécules TLR humaines [5, 85]

Les TLRs permettent une reconnaissance des pathogènes au niveau de la surface cellulaire et à l'intérieur au niveau des membranes endosomales. D'autres familles de récepteurs tels que les « NOD-like receptor » (NLR) ou les « RNA helicases » permettent également une reconnaissance cytosolique des composés bactériens et viraux, respectivement.

1-2-1-2-2) Les NLRs

Les NLRs sont des PRRs de signalisation localisés dans le cytosol. Ils répondent sélectivement à divers PAMPs et/ou DAMPs exprimés à l'intérieur des cellules infectées [49]. La famille des NLRs contient les protéines NOD1 et NOD2 [86] qui détectent le

peptidoglycane (PGN) bactérien [87, 88]. Cette interaction initie une cascade pro-inflammatoire via le facteur de transcription NF- κ B, nécessaire à l'élimination des bactéries pathogènes. Cette famille de protéines est également connue sous le nom de « NACHT-LRR-receptors » ou « CATERPILLER ». Les NLRs contiennent trois domaines distincts : un domaine effecteur CARD, un domaine NOD et un domaine LRR qui fixe le ligand. La famille des NLRs compte 22 membres divisés en NOD (NOD1-5), NALP (14 membres) et trois autres membres nommés IPAF, NAIP et CIITA. Les NLRs sont synthétisés dans une forme inactive avec leur domaine LRR replié sur la protéine, ce qui empêche son oligomérisation. La fixation d'un ligand permet alors l'oligomérisation du récepteur et donc une signalisation [86]. NOD1 et NOD2 reconnaissent respectivement l'acide γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic (DAP) et le muramyl dipeptide trouvé dans le peptidoglycane bactérien [89]. La reconnaissance d'un ligand par NOD1 et NOD2 induit leur oligomérisation et le recrutement de la kinase RIP2 par interaction avec leur domaine CARD. RIP2 permet ensuite l'activation de NF- κ B par l'activation de la molécule « NF- κ B activation modulateur » (NEMO) [90]. NOD1 et NOD2 sont exprimés par les cellules du système immunitaire (e.g. cellules dendritiques, macrophages). Les macrophages de souris déficientes pour le gène codant NOD2 ont un défaut d'activation de NF- κ B en réponse au muramyl dipeptide. De plus, NOD2 est indispensable pour l'expression d'un peptide antibactérien intestinal nommé cryptidine et les souris déficientes pour le gène codant NOD2 sont ainsi nettement plus sensibles à une infection par gavage de *Listeria monocytogenes* que les souris sauvages [91]. D'un autre côté, les réponses lymphocytaires à l'antigène formulé avec l'adjuvant complet de Freund sont diminuées chez des souris déficientes en NOD1 [92]. Outre les protéines NOD, les autres membres de NLRs n'ont tout simplement pas fait l'objet de nombreuses études, à l'exception de NLRP3 dont le rôle dans les processus immunitaires adaptatifs reste controversé [93, 94].

Contrairement aux TLRs, les NLRs sont aussi capables d'initier deux formes inflammatoires uniques de mort programmée, la pyroptose et la pyronécrose [95-97]. Des études ont montré que plusieurs NLRs sont capables d'induire des signaux nécessaires à l'activation des cellules T et B. De tous les NLRs, il est actuellement établi que les protéines NOD sont clairement et uniformément impliquées dans le lien entre immunité innée et immunité adaptative.

1-2-1-2-3) Les RLHs

Les ARNs viraux, qui sont synthétisés dans le cytoplasme des cellules ou présents dans le génome viral et relargués dans la cellule, échappent à la surveillance des TLRs. Cependant, les DC, issues de souris déficientes pour le gène codant TLR3 ou MyD88 sont toujours capables d'entrer dans un processus de maturation après infection par un virus (e.g. Virus de Sendai) [98]. Ce phénomène démontre la présence de mécanisme de reconnaissance virale autre que les TLRs. Cette reconnaissance des virus, indépendante des molécules TLR, est médiée par les ARN hélicases. Les protéines RIG-I et MDA5 sont des molécules cytosoliques, comprenant deux domaines CARD couplés à un domaine ARN hélicase appelé « DexD/H box helicase domain ». Le domaine CARD transmet le signal alors que le domaine ARN hélicase interagit avec les ARN bicaténaires [67, 69]. Les DC et les fibroblastes issus de souris déficientes pour le gène RIG-I ont ainsi une forte inhibition de production d'IFN de type I en réponse à des virus [69, 99]. De plus, une importante sensibilité aux infections virales a été démontrée chez les souris déficientes pour les gènes RIG-I et MDA5 [69]. RIG-I et MDA5 induisent une voie de signalisation aboutissant à l'activation d'IRF3, IRF7 et NF- κ B [67].

Les ARN double brin viraux sont toujours capables de stimuler les DC déficientes en TLR3 ; surtout lorsque celles-ci sont directement transfectées dans le cytosol [67]. Les RLHs MDA5 et RIG-1, en effet, ont été identifiés comme les récepteurs cytosoliques d'ARN viraux. Sous transfection cytosolique, les ARN double brin viraux induisent la production d'interférons de type I et la maturation des DC, ainsi qu'à travers le stimulateur du promoteur mitochondrial de l'IFN β (ou IPS-1) et la kinase TBK-1 [67]. RIG-1 a été décrit comme un récepteur cytosolique de l'ARN simple brin viral [100]. MDA5 et RIG-1 partagent la même voie de signalisation [101]. L'expression de RIG-1 spécifique du type cellulaire reste à clarifier. Cependant, la reconnaissance d'ARN simple brin indépendante des TLR est une caractéristique de cellules immunitaires et non immunitaires ; y compris les cellules mésangiales.

L'ensemble des PRRs associés aux cellules participe ainsi activement à la reconnaissance des pathogènes, à leur endocytose et signalent à la cellule la réponse adaptée aux pathogènes. Cet ensemble de récepteurs n'est pas figé mais interagit dans le but d'apporter une réponse optimale. Il est ainsi montré que plusieurs « scavenger receptors » ou lectines de type-C interagissent avec les TLRs [50].

1-2-2) Les PRR solubles

En plus des PRR associés aux cellules, le système immunitaire comprend des récepteurs solubles qui participent à l'opsonisation des pathogènes, facilitant leur reconnaissance et leur élimination.

Les PRRs solubles (ou opsonines) représentent le bras humoral du système immunitaire inné. Ils se lient aux microbes et servent principalement de ponts moléculaires entre les microorganismes et les facteurs du complément ou les récepteurs de phagocytose afin de faciliter leur destruction. Deux familles de PRRs solubles ont été décrites : les lectines de type C comprenant les collectines (mannose-binding lectin, surfactant protein A et D) et les ficolines (L-, M- et H-ficolins) [79, 102], et la famille des pentraxines (PTX) [103].

1-2-2-1) Les collectines et les ficolines

Les collectines appartiennent à la grande famille des lectines de type-C et sont constituées de neuf membres : « mannose binding lectin » (MBL), conglutinine, « surfactant protein » (SP)-A, SP-D, « collectin » (CL)-43, CL-46, CL-P1, CL-L1 et CL-K1. Alors que la conglutinine, CL-43 et CL-46 sont retrouvées uniquement chez les bovidés, les autres membres de cette famille sont exprimés chez l'homme. MBL est une protéine sérique produite par le foie et l'intestin grêle. SP-A et SP-D sont principalement produites par les épithéliums pulmonaires et sont ainsi retrouvées au niveau des alvéoles pulmonaires. SP-A est également produite par la muqueuse intestinale, le thymus et la prostate et se retrouve au niveau du liquide séminal et des muqueuses. CL-K1 est une protéine sérique exprimée par l'ensemble des tissus humains testés (e.g. colon, prostate, cœur, rein, foie, cerveau), à l'exception des muscles squelettiques et avec une faible expression dans la moelle osseuse. CL-L1 est exprimée de façon ubiquitaire (à l'exception des muscles squelettiques) et elle est particulièrement exprimée par le foie. CL-P1 est une collectine particulière car elle est exprimée à la membrane des cellules endothéliales. CL-P1 a également été qualifiée de « scavenger receptor » puisqu'elle reconnaît les Ox-LDL [104, 105].

La famille des ficolines est composée de trois membres : la H-ficoline (connue sous le nom d' « antigène Hakata »), la L-ficoline et la M-ficoline. Ces molécules sont des protéines sériques (de l'ordre de 3 à 4 µg/ml sauf la M-ficoline qui n'est pas retrouvée dans le sérum) produites par le foie et les épithéliums bronchiques pour la H-ficoline, par le foie pour la L-

ficoline, et par l'utérus, les monocytes, les PNNs et les cellules épithéliales alvéolaires pour la M-ficoline [106, 107]. La localisation de la M-ficoline est controversée. Cette ficoline n'est pas retrouvée dans le sérum mais semble être exprimée à la surface des monocytes. Pourtant, sa présence dans les granules des PNNs suggère que cette protéine pourrait être sécrétée [106, 107].

Les collectines et les ficolines possèdent une structure particulière, constituée de sous unités composées par trois chaînes polypeptidiques identiques. Chaque polypeptide de collectine est constitué de quatre régions : un court segment N-terminal de 7 à 28 acides aminés avec 1 à 3 cystéines, suivi d'une région similaire au collagène (« collagen like domain ») caractérisé par la répétition du motif –Gly-Xaa-Yaa-. L'extrémité C-terminale contient le domaine de reconnaissance des carbohydrates (CRD) de type-C relié au domaine collagène par une courte région charnière (« neck ») de 24 à 28 résidus. La région collagène forme une triple hélice et la région charnière « neck » forme un domaine stable « coiled-coils » [108]. Le polypeptide des ficolines possède une organisation similaire à l'exception de la perte de la région « neck ». De plus, les ficolines ne possèdent pas de domaine CRD de type-C mais un domaine fibrinogène. Le nombre de sous unités trimériques diffère entre les collectines (e.g. SP-D contient 4 trimères alors que SP-A et MBL contiennent 6 trimères) et les ficolines (e.g. L-ficoline contient 4 trimères alors que la H-ficoline contient 3 trimères).

Les collectines reconnaissent sélectivement le mannose, le glucose, le L-fucose, la N-acetyl-mannosamine et la N-acetyl-glucosamine. Chaque collectine possède des affinités particulières pour les différents sucres. MBL et SP-A possèdent ainsi une forte spécificité respectivement pour le N-acetyl-glucosamine et le N-acetyl-mannosamine [108, 109]. La capacité de reconnaissance des carbohydrates par les ficolines réside dans leur domaine fibrinogène. Les ficolines reconnaissent le N-acetyl-glucosamine. Une différence critique entre ficolines et collectines réside dans le fait que le calcium est indispensable à la reconnaissance des carbohydrates par les collectines alors qu'il n'est pas nécessaire pour les ficolines [108]. Cependant, cette observation peut être discutée puisque H- et L-ficolin reconnaissent les cellules apoptotiques (via l'ADN pour la L-ficoline) de manière dépendante du calcium [110, 111].

Les collectines et les ficolines reconnaissent un grand nombre de pathogènes (e.g. virus, bactéries, champignons). MBL et SP-A reconnaissent par exemple *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Aspergillus fumigatus* alors que la L-ficoline reconnaît *Salmonella typhimurium*, permettant leur agrégation et donc une meilleure élimination [108]. SP-A se fixe, par son domaine collagène, sur les macrophages alvéolaires

de rat via le récepteur SP-R210. L'inhibition de ce récepteur par un anticorps diminue la phagocytose de *Mycobacterium bovis* opsonisé par SP-A [112]. De la même manière, CR1 (CD35), qui se trouve exprimé à la membrane des PNNs stimulés (CR1 est stocké dans les vésicules de sécrétion), est un récepteur pour MBL et permet la phagocytose de *Salmonella montevideo* opsonisé par MBL [113]. L'importance *in vivo* de ces molécules est rapportée par plusieurs études qui montrent une sensibilité accrue des souris déficientes en MBL à une infection par *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa* [114, 115].

Ces molécules peuvent également activer la cascade du complément par la voie des lectines et participer ainsi à l'élimination des microorganismes. MBL et les ficolines s'associent avec trois protéases à sérine nommées « MBL-associated serine protease » (MASP) et une protéine non-protéase (Map19) [108, 116]. Ces protéases activent le complément. Ainsi, MASP-2 active C4 et C2 pour former la C3 convertase (C4bC2a), MASP-1 active également C2 et la présence de MASP-1 potentialise la formation de la C3 convertase [117] (cf. Figure 5). A ce jour, aucun facteur du complément n'a été montré comme étant activé par MASP-3, et les molécules SP-A et SP-D ne s'associent pas aux MASPs et n'activent donc pas le complément [109].

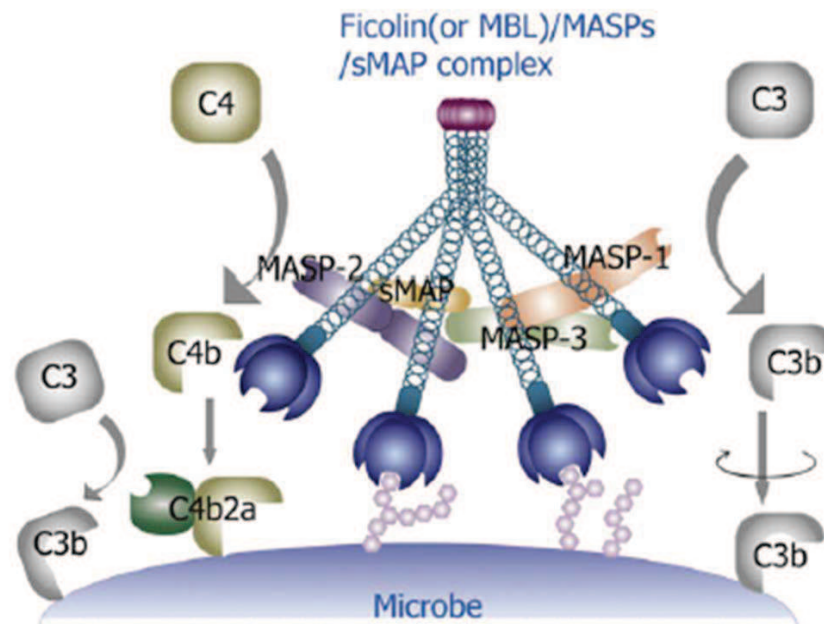


Figure 5 : Représentation de la voie d'activation du complément par la voie des lectines. La reconnaissance de carbohydrate par MBL ou par les Ficoline permet l'activation des MASP. MASP-1 induit l'activation de C3 et C2 alors que MASP-2 induit l'activation de C4 et C2. (D'après [106]).

Ces molécules se fixent également aux cellules apoptotiques. MBL, ainsi que la L-ficoline et la H-ficoline, reconnaissent les cellules en apoptose tardive et augmentent leur élimination par les phagocytes [110, 111, 118]. Les souris déficientes pour le gène codant MBL ont ainsi un déficit d'élimination des cellules apoptotiques [119]. MBL reconnaît la cellule apoptotique par son domaine CRD et favorise la phagocytose des cellules apoptotiques par la fixation de son domaine collagène à la calréticuline qui est complexée au récepteur d'endocytose CD91 à la surface des macrophages [119]. La H-ficoline reconnaît également la calréticuline et se fixe aux cellules apoptotiques de manière dépendante du calcium. Le domaine de reconnaissance exposé par les cellules apoptotiques reste à déterminer mais il semble que la L-ficoline, mais pas la H-ficoline, se fixe à l'ADN [110, 111].

Ces molécules interviennent également dans la régulation de la réponse inflammatoire. En effet, SP-A et SP-D se fixent sur la molécule « signal regulating protein α » (SIRP- α) via leur domaine CRD et inhibent ainsi la signalisation intracellulaire et la production de cytokines et de chimiokines inflammatoires (e.g. CXCL2 et TNF α) par le macrophage activé. A l'inverse, des mutants de SP-A et SP-D, déplétés de leur domaine CRD, sont reconnus par la calréticuline et augmentent la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires (e.g. TNF α , CXCL2) par le macrophage activé [120]. Ces effets ont été confirmés *in vivo* puisque l'injection de SP-A et SP-D une heure avant l'initiation de l'inflammation par le LPS induit une diminution de la production de TNF α , de CXCL2 et de CCL2. Ainsi, chez un sujet sain, SP-A et SP-D peuvent se fixer par leur domaine CRD sur SIRP- α et inhiber une réponse inflammatoire, alors que la présence de pathogènes bloque le domaine CRD et oblige SP-A et SP-D à se fixer sur le macrophage en induisant une réponse inflammatoire. L'effet anti-inflammatoire n'est pas retrouvé avec MBL et induirait seulement un effet pro-inflammatoire [120]. Une autre étude démontre que MBL, en se fixant au niveau des N-acetyl-glucosamine du peptidoglycane, inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires et augmente la production de chimiokines par le macrophage. Ainsi, MBL participerait à la résolution de la réponse inflammatoire en inhibant l'inflammation induite par le macrophage et en recrutant les phagocytes qui éliminent les cellules apoptotiques et les pathogènes au niveau du foyer d'infection [104].

1-2-2-2) Les pentraxines

La superfamille des pentraxines, définie par une signature moléculaire HxCxS/TWxS où x représente n'importe quel acide aminé, comprend les PTXs courtes (C-reactive protein [CRP] et serum amyloid P [SAP]) [121] et les pentraxines longues. La Pentraxine 3 (PTX3) et la pentraxine 4 [122] décrite récemment font partie, avec les pentraxines neuronales (NPTX), des pentraxines longues [103, 123] (cf. figure 6). CRP a été, durant les années 30, le premier membre de la famille des PRRs découvert dans le sérum de patient en réponse à une infection. Les pentraxines sont hautement conservées durant l'évolution et sont ainsi retrouvées chez les mammifères, les arthropodes (*e.g. Limulus polyphemus, Drosophila melanogaster*), les amphibiens, les oiseaux et les vertébrés inférieurs (*Xenopus laevis, zebrafish, Danio rerio*) [103, 124].

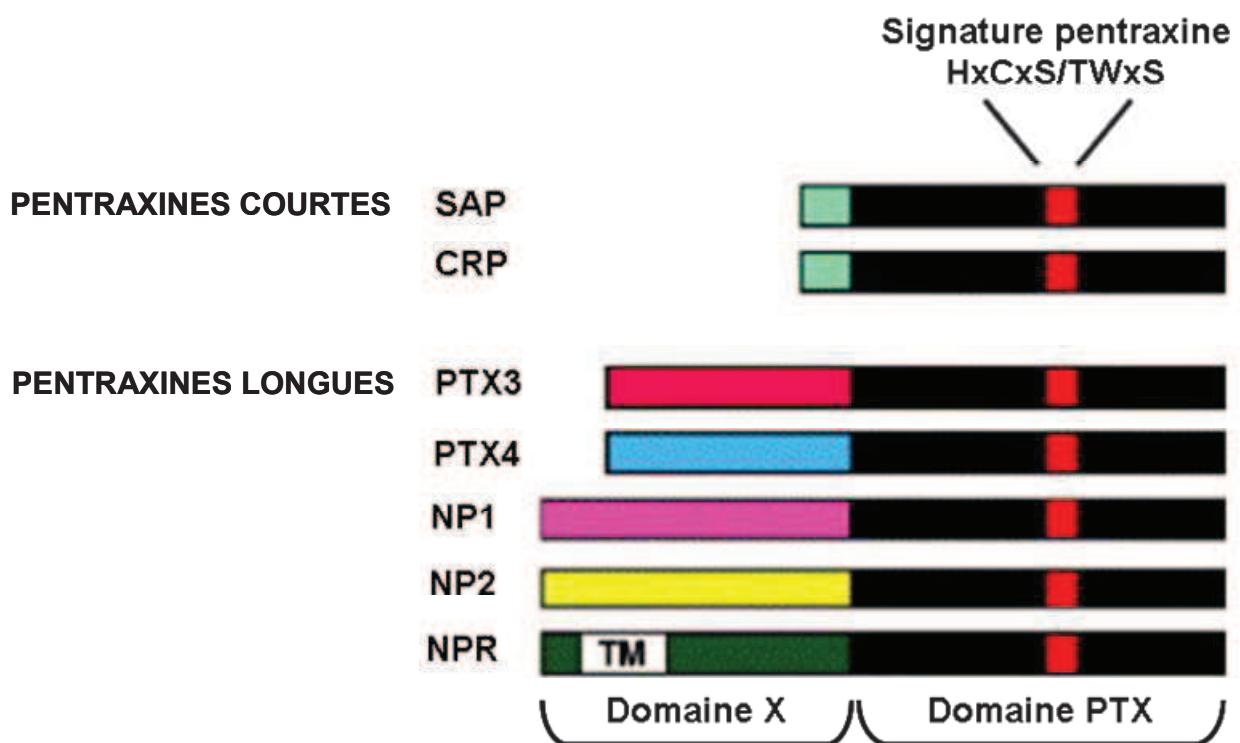


Figure 6 : Représentation schématique de la structure des pentraxines humaines. Les pentraxines sont divisées en deux sous-groupes : les pentraxines courtes (SAP et CRP) et les pentraxines longues (PTX3, PTX4, NP1, NP2 et NPR). La région C terminale contient la signature moléculaire des pentraxines. Les pentraxines longues, en comparaison des pentraxines courtes, présentent une séquence N terminale supplémentaire n'ayant aucune homologie avec aucune autre molécule connue. (Adaptée d'après [125]).

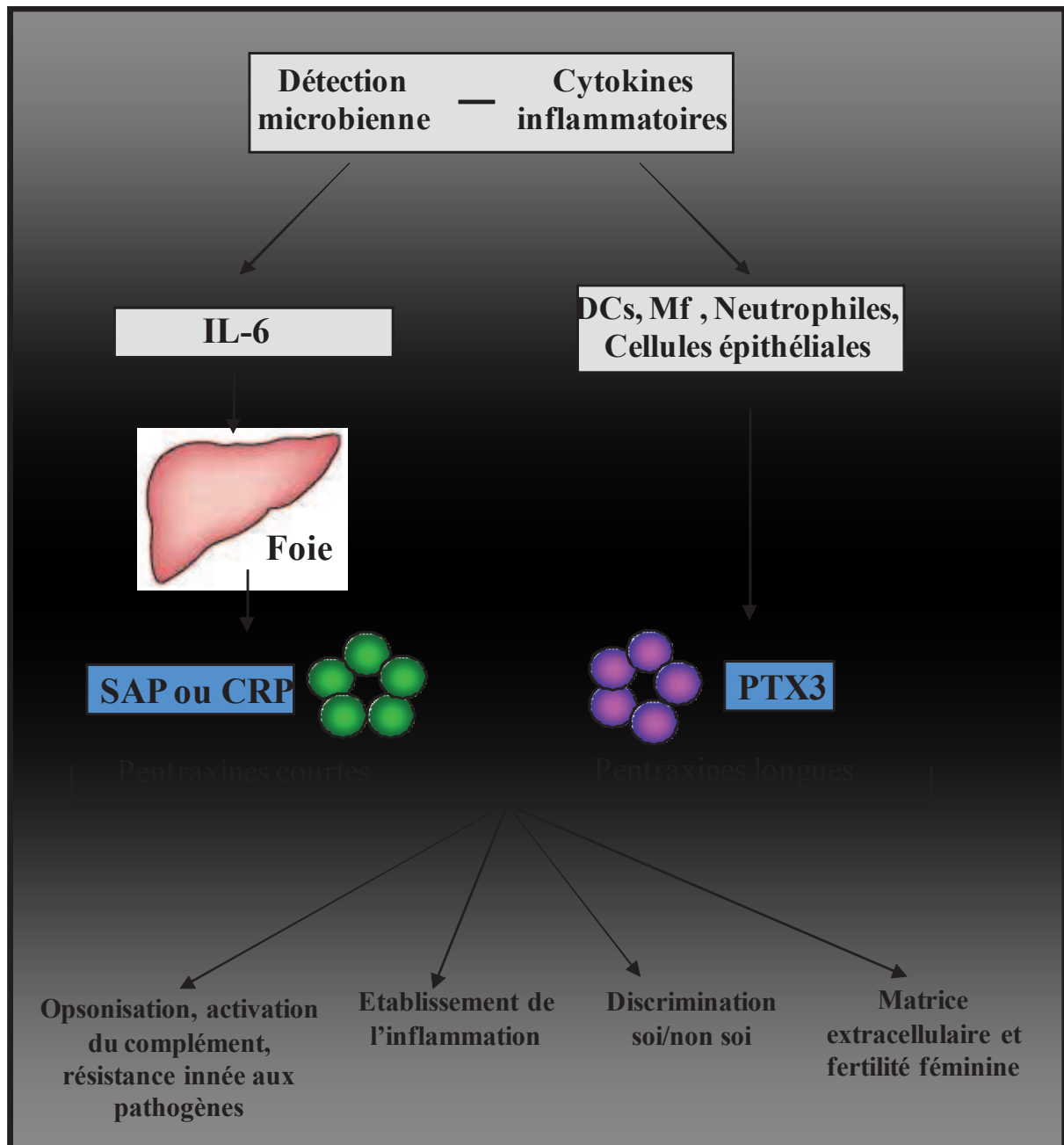


Figure 7 : Induction et sources de production des pentraxines. Les pentraxines jouent le rôle d'opsonines et participent l'établissement de la réponse immunitaire (Adaptée d'après [125])

1-2-2-2-1) Les pentraxines courtes

Les pentraxines courtes CRP et SAP sont des protéines de la phase aigue de l'inflammation [126], rapidement produites par le foie en cas d'infection (cf Figure 7). CRP et SAP possèdent 51% d'identité de séquence en acides aminés et proviennent de la duplication d'un gène ancestral [103]. Au niveau structural, CRP est composée de cinq monomères (un

monomère est composé de 206 acides aminés) identiques formant un pentamère qui a ainsi donné le nom de Pentraxine à cette famille. CRP contient deux cystéines en position 36 et 97, retrouvées chez les autres membres de la famille, qui permettent la formation de ponts disulfure intrachaines. Elle contient également deux atomes de calcium par monomère [103, 127]. CRP est constituée de cinq monomères s'associant, de façon non covalente, pour former un pentamère de 115 kDa. CRP est produite par les hépatocytes en réponse à la cytokine pro-inflammatoire IL-6 et son expression est potentialisée par l'IL-1 β [128]. Chez un sujet sain, la concentration plasmatique médiane de CRP est de 0,8 mg/l mais peut augmenter de 1000 à 10000 fois lors d'une inflammation aiguë [127]. A la différence de l'homme, la CRP murine est une protéine faiblement exprimée avec un maximum de concentration sérique d'environ 2 mg/l [127].

SAP est une glycoprotéine plasmatique retrouvée principalement chez la souris. En effet, cette protéine est la principale protéine sérique de la phase aiguë de l'inflammation chez la souris (augmente de 20 à environ 200 mg/l) mais se trouve constitutivement exprimée de 30 à 50 mg/l dans le sérum humain [103, 129]. Le monomère de SAP est une protéine de 204 acides aminés (25 kDa) qui s'assemble pour former un pentamère de 127 kDa. Deux pentamères peuvent également s'assembler face à face pour former un décamère [130]. De la même manière que CRP, chaque monomère de SAP peut fixer deux ions calcium.

La fonction de PRR de CRP et SAP implique une reconnaissance (dépendante du calcium) de différents ligands regroupés dans le tableau 3. CRP a d'ailleurs été mise en évidence et caractérisée sous la forme d'une fraction protéique capable de se lier à la phosphorylcholine qui est un composant majeur de la fraction C de la capsule du pneumocoque, d'où sa dénomination C-Reactive Protein. La phosphocholine a également été identifiée sur les bactéries Gram positif (e.g. *Clostridium* spp, *Lactococcus* spp, et *Bacillus* spp) et Gram négatif (*Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitidis*, and *Neisseria gonorrhoeae*). CRP fixe également les champignons (e.g. *Aspergillus fumigatus*), les levures (fixation au zymosan) [103, 131], les cellules apoptotiques, la composante C1q du complément (cf Figure 8) et les histones [103, 132, 133]. SAP reconnaît plusieurs microorganismes Gram négatif tels que *Neisseria meningitidis*, *Klebsiella rhinoscleromatis* ou Gram positif tels que *Streptococcus pyogenes* mais ne reconnaît pas *Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli* [134].

	CRP	SAP	PTX3
Composants du complément			
C1q	+	+	+
Facteur H	+		+
"C4b-binding protein"		+	-
Protéines de la matrice extracellulaire			
TSG-6			+
"Inter- α -trypsin inhibitor"	-		+
Hyaluronane			-
Laminine	+	+	-
Collagène IV		+	-
Fibronectine	+	+	-
Facteurs de croissance			
FGF2	+/-		+
FGF1			-
FGF4			-
Protéines membranaires			
phosphocholine	+	+	+
phosphoethanolamine	-	+	-
LPS	-	+	-
KpOmpA			+
Pathogènes			
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+		+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			+
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	+	+
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>			+
Virus	-	+	+
Zymosan	+	+	+
Autres ligands			
Cellules apoptotiques	+	+	+
Histones	+	+	+
Héparine	-	+	-

Tableau 3 : Principaux ligands décrits des pentraxines. (D'après [103] et [123])

Abbreviations : TSG : « TNF-stimulated gene », FGF : fibroblast growth factors.

Le virus influenza et le LPS sont également des ligands décrits de SAP [135]. SAP inhibe ainsi la fixation du LPS aux monocytes et l'activation des PNNs par le LPS [136]. Certains auteurs montrent que SAP fixe les souches de *Escherichia coli* exprimant un LPS rugueux mais pas les souches exprimant un LPS lisse, alors que d'autres présentent la fixation de SAP sur les LPS lisse et rugueux [136, 137]. SAP reconnaît également les cellules apoptotiques [138], les histones [133] ainsi que C1q et des protéines de la matrice extracellulaire (e.g. fibronectine, laminine) [103].

CRP et SAP sont impliquées dans de nombreuses fonctions. En effet, ces deux molécules permettent une opsonisation des cellules apoptotiques et leur élimination par les phagocytes [132, 138]. Le rôle de ces PRRs dans la défense contre les pathogènes est montré par plusieurs modèles murins. Ainsi, une première étude révèle qu'un traitement par CRP, mais pas par SAP, augmente la survie des souris infectées par *Streptococcus pneumoniae*. Des travaux ont également montré que les souris surexprimant CRP sont moins sensibles à une infection par ce pathogène que les souris sauvages [139, 140]. Les souris surexprimant CRP sont également résistantes à une infection par *Salmonella enterica* [141] : les souris surexprimant CRP éliminent rapidement ces microorganismes de la circulation sanguine et le titre des anticorps anti-salmonella 14 jours après l'infection est 10 fois plus important dans les souris surexprimant la CRP que dans les souris sauvages [141]. Cet effet de protection peut être médié par l'opsonisation des microorganismes par CRP avec pour conséquence, une augmentation de leur phagocytose, une destruction des microorganismes par activation du complément et potentialisation de l'activation des leucocytes (CRP augmente la sécrétion de TNF α et d'IL-1 β par les leucocytes en réponse à *Streptococcus pneumoniae*) [131, 142]. L'effet protecteur de CRP sur l'infection par *Salmonella enterica* peut paraître étrange puisque des travaux indiquent que CRP ne reconnaît pas ce pathogène [141]. Cependant, une étude assez récente démontre la reconnaissance de *Salmonella enterica* par CRP uniquement en présence de plasma. CRP interagit avec la L- et la M-ficoline, via leur domaine fibrinogène, permettant la reconnaissance du microorganisme par la CRP et potentialisant l'activation du complément [143] (cf Figure 8). Ces travaux montrent ainsi la collaboration entre deux PRRs solubles dans la reconnaissance d'un pathogène. Cependant, les récents travaux de Suresh et collègues montrent que l'effet protecteur de CRP contre l'infection par *Streptococcus pneumoniae* est indépendant de la reconnaissance de ce pathogène par CRP [144]. En effet, des mutations sur CRP inhibent la reconnaissance de *Streptococcus pneumoniae* (même en présence de sérum) sans affecter son effet protecteur sur l'infection par ce pathogène [144, 145]. CRP reconnaît également *Haemophilus influenzae* via le motif

phosphocholine du LPS et permet l'élimination du pathogène dans le sérum par l'activation du complément [146].

Le rôle de CRP dans un choc septique médié par le LPS n'est pas totalement élucidé. En effet, des souris surexprimant la CRP montrent une résistance plus importante à un choc septique médié par le LPS que les souris sauvages [147]. De plus, l'injection intraveineuse de CRP humaine protège les souris d'un choc septique médié par le LPS. Cet effet est dépendant de l'expression du récepteur aux immunoglobulines FcγRIIb (CD32b) puisque les souris déficientes pour le gène codant pour ce récepteur présentent une mortalité exacerbée lors de l'injection par CRP [148, 149]. Cette étude montre que CRP induit un effet anti-inflammatoire, et donc protecteur, chez les souris sauvages (augmentation de la concentration sérique de l'IL-10 sans affecter celle du TNFα et de l'IL-12) alors qu'un effet pro-inflammatoire, et donc délétère, est retrouvé chez les souris n'exprimant pas CD32b (augmentation de la concentration sérique du TNFα et de l'IL-12) [142]. A l'inverse, une étude indépendante ne montre aucune protection de CRP (souris surexprimant CRP ou administration de CRP) lors d'un choc septique induit par le LPS [150]. Ces différents résultats reflètent certainement les variations des modèles utilisés (CRP provenant de différentes espèces, LPS provenant de différentes souches de microorganismes) et montrent que de nouvelles investigations sont nécessaires.

A la différence de CRP, la fixation de SAP sur un pathogène inhibe la reconnaissance de ce pathogène par les phagocytes (PNNs) et augmente la virulence de ces microorganismes. Ainsi, SAP reconnaît *Streptococcus pyogenes* mais les souris déficientes pour le gène codant SAP sont plus résistantes que les souris sauvages à ce pathogène. A l'inverse, les souris sauvages sont plus résistantes à un pathogène qui n'est pas reconnu par SAP (e.g. *Escherichia coli* O111:B4) [137]. Les auteurs montrent également que SAP ne protège pas les souris d'un choc septique médié par le LPS mais protège les souris (administration de SAP ou utilisation des souris surexprimant SAP) de l'effet létal de la « shiga toxin 2 » exprimée par *Escherichia coli* O157:H7 [151]. A l'inverse des microorganismes, la reconnaissance des cellules apoptotiques par SAP augmente leur élimination par les phagocytes [138].

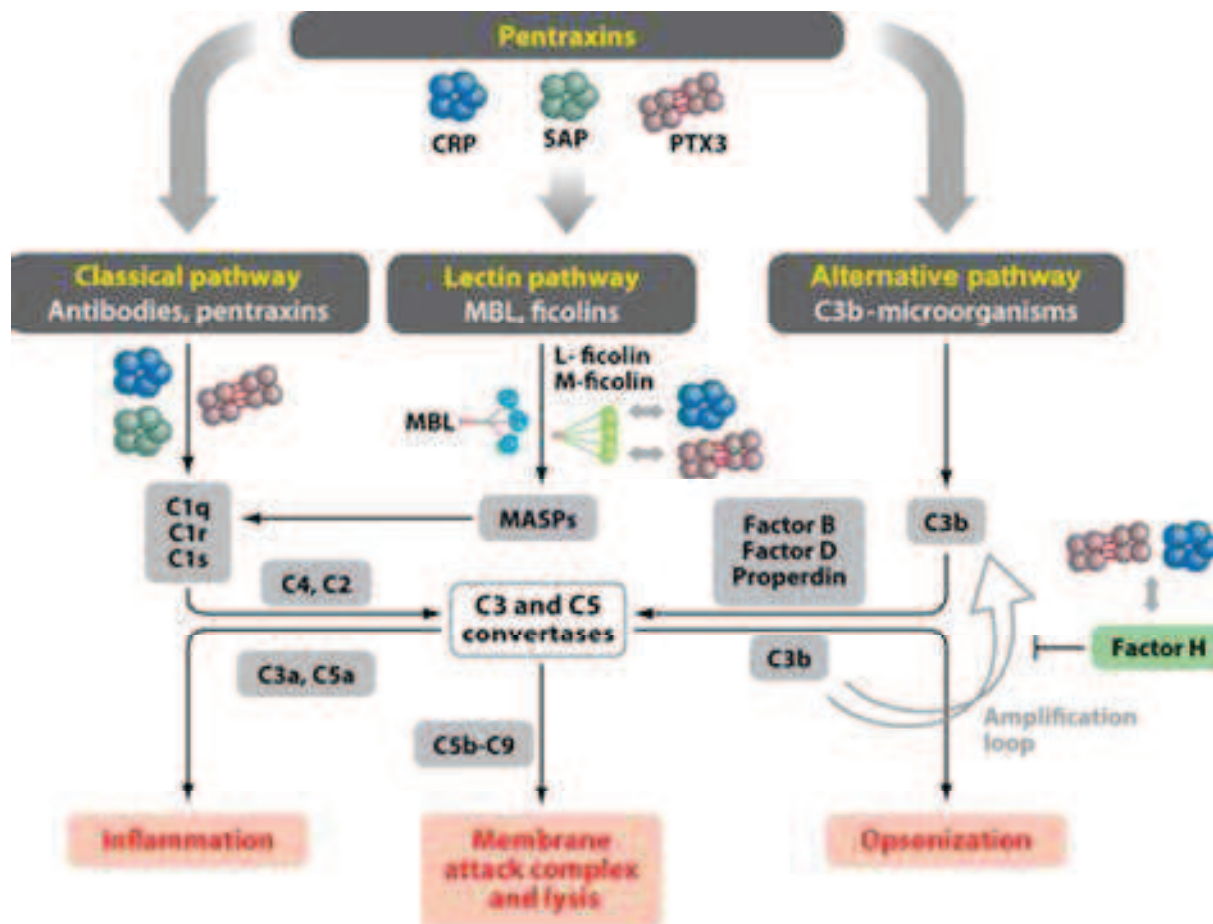


Figure 8 : Rôles des pentraxines dans l'activation et la régulation du complément. Les voies classique et lectine sont initiées lorsque les molécules de détection (anticorps ou pentraxines et MBL ou ficolines, respectivement) lient la structure d'activation (e.g. antigènes ou composants microbiens). La voie alternative est initiée par auto-activation de C3 sur les molécules de surface cellulaire des microorganismes. Les pentraxines participent dans l'activation et la régulation du complément à travers les trois voies en interagissant avec C1q (SAP, CRP, PTX3), avec les ficolines (CRP, PTX3) et avec le facteur H (CRP, PTX3) (D'après [152])

1-2-2-2-2) Les pentraxines longues

Comme précédemment évoqué, la molécule PTX3 forme, avec PTX4 (récemment caractérisée) et les neuropentraxines, la sous famille des pentraxines longues dont elle est le prototype. La concentration de PTX3 dans le sang chez un sujet sain est relativement faible (environ 25 ng/ml chez la souris et moins de 2 ng/ml chez l'homme) mais augmente fortement

(jusqu'à 1000 ng/ml) et très rapidement (pic de PTX3 détecté entre 5 et 8 heures) lors de conditions inflammatoires (e.g. septicémie, choc septique, infarctus du myocarde) [153, 154].

Le gène humain *ptx3* code pour un transcrit de 1861 bases organisé en trois exons et localisé sur le chromosome 3. Les deux premiers exons codent pour le peptide signal et le domaine N-terminal alors que le troisième exon code pour le domaine C-terminal contenant le domaine pentraxine. Cette molécule fut découverte à partir de cellules endothéliales stimulées par l'IL1- β et par des fibroblastes stimulés par le TNF- α . PTX3 est également nommée TSG-14 (« TNF stimulated gene-14 ») [155, 156]. PTX3 est une protéine de 381 acides aminés comprenant un peptide signal de 17 acides aminés et constituée d'un domaine pentraxine de 203 acides aminés couplé à un domaine N-terminal de 178 acides aminés. L'analyse de la séquence de PTX3 indique un poids moléculaire théorique de 40 165 Da et la présence d'un site de glycosylation au niveau de d'une asparagine en position 220. Cette glycosylation induit un poids moléculaire d'environ 45 kDa qui diminue à 40 kDa après traitement par la N-glycosidase [125]. Une isoélectrofocalisation de PTX3 présente cinq bandes situées entre les points isoélectriques 4,5 et un de 4,65, suggérant une glycosylation hétérogène de PTX3 [125].

Comparativement à CRP et SAP, la molécule PTX3 présente un domaine amino-terminal n'ayant aucune homologie avec aucune autre molécule connue. PTX3 est impliquée dans la fertilité, le dépôt matriciel et l'immunité innée [121]. Plus précisément, PTX3 fixe certains microorganismes et favorise leur élimination par les phagocytes. A l'inverse de CRP et SAP, PTX3 est produite par de nombreux types cellulaires (monocytes/macrophages, cellules dendritiques, cellules endothéliales, PNNs) à l'exception notable du foie [157] (cf Figure 7). PTX3, comme CRP et SAP, reconnaît C1q et permet l'activation de la voie classique du complément [118, 125, 158] (cf. Figure 8). C1q est composé d'une tête globulaire située au niveau de son extrémité C-terminale relié à un domaine [159] similaire au collagène puis à une extrémité N-terminale riche en cystéines impliqué dans la formation de ponts disulfure [159]. La formation du complexe PTX3/C1q se fait via l'interaction du domaine pentraxine de PTX3 avec la tête globulaire de C1q [160]. Alors que la multimérisation de PTX3 est indispensable pour une interaction optimale avec le domaine globulaire de C1q [156], la déglycosylation et la désialylation de PTX3 potentialisent son interaction avec C1q et l'activation du complément. Cet effet n'est pas dû à une augmentation de l'affinité entre PTX3 et C1q, mais à une diminution de leur dissociation et donc une stabilisation du complexe PTX3/C1q [161]. La reconnaissance de PTX3 « immobilisée » par

C1q permet une activation du complément (cf Figure 8) alors que PTX3 soluble séquestre C1q et l'empêche d'interagir avec ses ligands [160].

PTX3 reconnaît également les cellules en apoptose tardive mais, à la différence des pentraxines courtes SAP et CRP, elle inhibe leur reconnaissance par les phagocytes (e.g. cellules dendritiques et macrophages) [162, 163].

De nombreux travaux ont souligné l'importance des PRR solubles dans l'initiation d'une réponse immune adaptative. Ainsi, des souris déficientes en PTX3 sont sensibles à l'infection par *Aspergillus fumigatis*, et développent une réponse de type Th2 non protectrice [164, 165]. De plus, PTX3 se comporte comme un récepteur soluble pour la molécule bactérienne OmpA et module ses propriétés pro-inflammatoires [76]. L'ensemble des ligands de PTX3 décrits à ce jour sont consignés dans le tableau 3.

Les opsonines permettent donc une agrégation de pathogènes, augmentent leur phagocytose de manière directe (opsonisation) ou indirecte (activation du complément), modulent la réponse inflammatoire et interviennent dans l'élimination des cellules apoptotiques en facilitant leur élimination et en permettant ainsi la résolution de l'inflammation.

Actuellement, de nombreuses études portent sur l'analyse des interactions établies entre les PAMPs et les PRRs, les coopérations établies entre les différents types de PRR et les conséquences fonctionnelles sur la génération d'une réponse immune adaptative. Un autre volet de ces travaux porte sur l'analyse des mécanismes mis en jeu par les microorganismes, et en particulier les virus, pour subvertir ou détourner le système immunitaire.

2. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

Vingt sept ans après les premiers cas avérés du SIDA et vingt cinq ans après la découverte de l'agent étiologique, le contrôle efficace de la pandémie demeure évasif. La composante moléculaire impliquée dans la pathogenèse liée au VIH-1 est à l'origine de ce challenge. En effet, le VIH-1 développe depuis toujours un certain nombre de mécanismes lui permettant d'échapper au contrôle immunitaire. Parmi les mécanismes les plus importants, la forte glycosylation de la glycoprotéine de surface qui protège entre autres les épitopes de neutralisation, le ciblage direct du virus de la molécule CD4 exprimée par les lymphocytes T dans l'orchestration immunitaire ; l'intégration dans le génome de la cellule hôte, responsable de l'infection permanente des cellules non éliminées. Ces mécanismes impliquent également la capacité du virus à muter, pour ainsi échapper au système immunitaire de l'hôte [166, 167]. Ce dernier mécanisme conduit à un degré important de la diversité virale au sein du VIH-1, ainsi que son adaptation rapide, en réponse, à la fois à l'activité du système immunitaire et la thérapie antirétrovirale. Toutefois, au cours de la dernière décennie, les progrès en matière de séquençage et de surveillance élargie de la maladie ont permis de caractériser la variation du VIH-1 chez chaque patient et dans le monde.

Ainsi, la classification du VIH en sous-types distincts doit maintenant tenir compte de la réalité d'un processus dynamique de l'évolution génétique par lequel de nouvelles souches du VIH-1 ne cessent d'émerger. En effet, la diversité virale résultante a des conséquences dans les possibles taux différentiels de progression de la maladie, des réponses à la thérapie antirétrovirale et du développement des vaccins.

2-1) Histoire du VIH

Les premiers cas reconnus de SIDA ont été décrits aux Etats-Unis dans le début des années 1980. Un certain nombre d'hommes homosexuels, à New York et en Californie, se mirent soudain à développer des rares infections opportunistes et des cancers qui semblaient résistants à tout traitement. A cette époque, le SIDA n'a pas encore de nom, mais il est vite devenu évident que tous ces hommes étaient atteints d'un syndrome commun.

Le VIH est un lentivirus, et comme tous les virus de ce type, il attaque le système immunitaire. Les lentivirus font partie d'un groupe plus important de virus appelés rétrovirus.

Le nom «lentivirus» signifie littéralement «virus lent» car ils prennent tant de temps pour produire tous les effets indésirables dans un organisme. Ils sont retrouvés dans un certain nombre d'animaux, notamment les chats, moutons, chevaux et bovins. Toutefois, le lentivirus le plus intéressant en matière d'investigation sur les origines du VIH est le virus de l'immunodéficience simienne (VIS), qui affecte les singes.

L'infection à VIH/Sida s'est développée à la fin du XX^e siècle et représente sans conteste le prototype de la maladie émergente dont les conséquences sont dramatiques. L'infection par le VIH est devenue une pandémie qui infecte plusieurs millions de personnes parmi lesquelles plus de 70 % vivent en Afrique sub-saharienne [168]. Le nombre de personnes vivant avec le VIH dans le monde en 2009 est estimé à 33,6 millions [169, 170], (ONUSIDA/OMS, 2009). D'ores et déjà, plus de 25 millions de personnes sont mortes du SIDA et le VIH continue au XXI^e siècle d'être l'une des premières causes de mortalité dans les pays du Sud [171]. En effet, même si certains se sont longtemps opposés à reconnaître le lien, il est maintenant clairement établi que le VIH est l'agent étiologique du SIDA. Ainsi, afin de trouver la source du SIDA, il est nécessaire de rechercher l'origine du VIH, et de découvrir comment, quand et où le VIH a commencé à provoquer des maladies chez les humains.

2-1-1) Origine simienne du VIH

Le VIH fait partie de la famille des rétrovirus. Ces virus sont très répandus dans le monde animal. Une enzyme, la transcriptase inverse, permettant la rétrotranscription de l'ARN en ADN, caractérise ces virus. Trois sous-groupes existent actuellement au sein des rétrovirus humains : les oncovirus à ARN de type HTLV (*human T-lymphotropic virus*), les spumavirus et enfin les lentivirus dont font partie les VIH. Les VIH-1 et VIH-2 sont les agents étiologiques du SIDA. Les virus de l'immunodéficience simienne (VIS) les plus proches du VIH-1 sont le VIScpz et VISgor qui infectent naturellement les chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*) et les gorilles (*Gorilla gorilla*) d'Afrique Centrale de l'ouest. Les VISsmm retrouvés chez les mangabeys enfumés (*Cercocebus atys*) d'Afrique de l'Ouest sont les plus proches du VIH-2 [169, 172-174]. Peu de temps après la découverte en 1983 du VIH-1, le premier VIS, VISmac, fut isolé du macaque rhésus (*Macaca mulatta*) dans un centre de primatologie aux États-Unis, le *New England Regional Primate Research Center* (NERPRC). Des études rétrospectives montrèrent que ce virus fut introduit au NERPRC par d'autres singes rhésus provenant d'un centre de primatologie Californien où s'était développée à la fin

des années 1960 une épidémie chez les singes, caractérisée par la survenue d'une immunodépression avec l'apparition d'infections opportunistes. De nombreuses études attribuent l'origine du VIH-1 au VIS (VIScpz) qui infecte les chimpanzés (*Pan troglodytes*) [175-177] (cf. figure 9). Le VIH-2, qui partage 40 à 60% d'homologie avec le VIH-1, aurait pour origine le VISmm du mangabey enfumé ouest africain (*Cercocebus atys*) [177-179] (cf. figure 9). Les bases moléculaires et la distribution des séquences génomiques renverraient le passage du VIS chez l'homme entre 1915 et 1941 [170, 180, 181]. De façon surprenante, même en présence d'une forte charge virale chez son hôte naturel, le VIS ne provoque ni le SIDA, ni la déplétion progressive des lymphocytes T CD4 observés chez l'humain ou chez le macaque rhésus (*Macaca mulatta*), chez qui l'on note une grande susceptibilité aux infections opportunistes [178, 182].



Figure 9 : Origine simienne du VIH. (A) Le VIH-1 a pour origine un seul sous type de chimpanzés, *Pan troglodytes*. (B) Le VIH-2 a pour origine le Sooty mangabey, *Cercocebus atys*. (C) Le phénogramme radial démontre l'étroite relation entre VIH et VIS ; les distances indiquant le degré relatif d'évolution de la parenté (D'après [177]).

2-1-2) Modes de transmission du VIH

Le VIH est un virus qui affaiblit le système immunitaire et, sans traitement, conduit la plupart des personnes infectées à développer le SIDA. Comme tous les virus, le VIH infecte les cellules d'un organisme vivant afin de se répliquer. Le VIH est présent dans le sang et autres fluides corporels comme le sperme, les sécrétions vaginales et le lait maternel. Le virus peut pénétrer dans le corps par contact avec le sang ou par passage à travers les membranes muqueuses délicates, comme l'intérieur du vagin, le

rectum ou l'urètre. En effet, la première cause de contamination reste la transmission sexuelle [183], dont le risque à chaque contact s'évalue entre 0,1% et 1% [184, 185]. L'usage d'aiguilles contaminées par les toxicomanes, ou plus accidentellement par les personnels de santé et de recherche ; ou en cas de transfusion sanguine au cours de la transplantation sont autant des risques de contamination par voie sanguine.

La transmission dite verticale de la mère à l'enfant peut survenir à différents stades : *in utero*, lors de l'accouchement ou au cours de l'allaitement maternel. Ainsi, grâce à l'administration de traitements antirétroviraux au début ou pendant le dernier trimestre de grossesse, le taux de transmission verticale est de 10%, alors qu'il est de 25% en absence de traitement [186].

2-1-3) Variabilité du VIH : Classification et Nomenclature

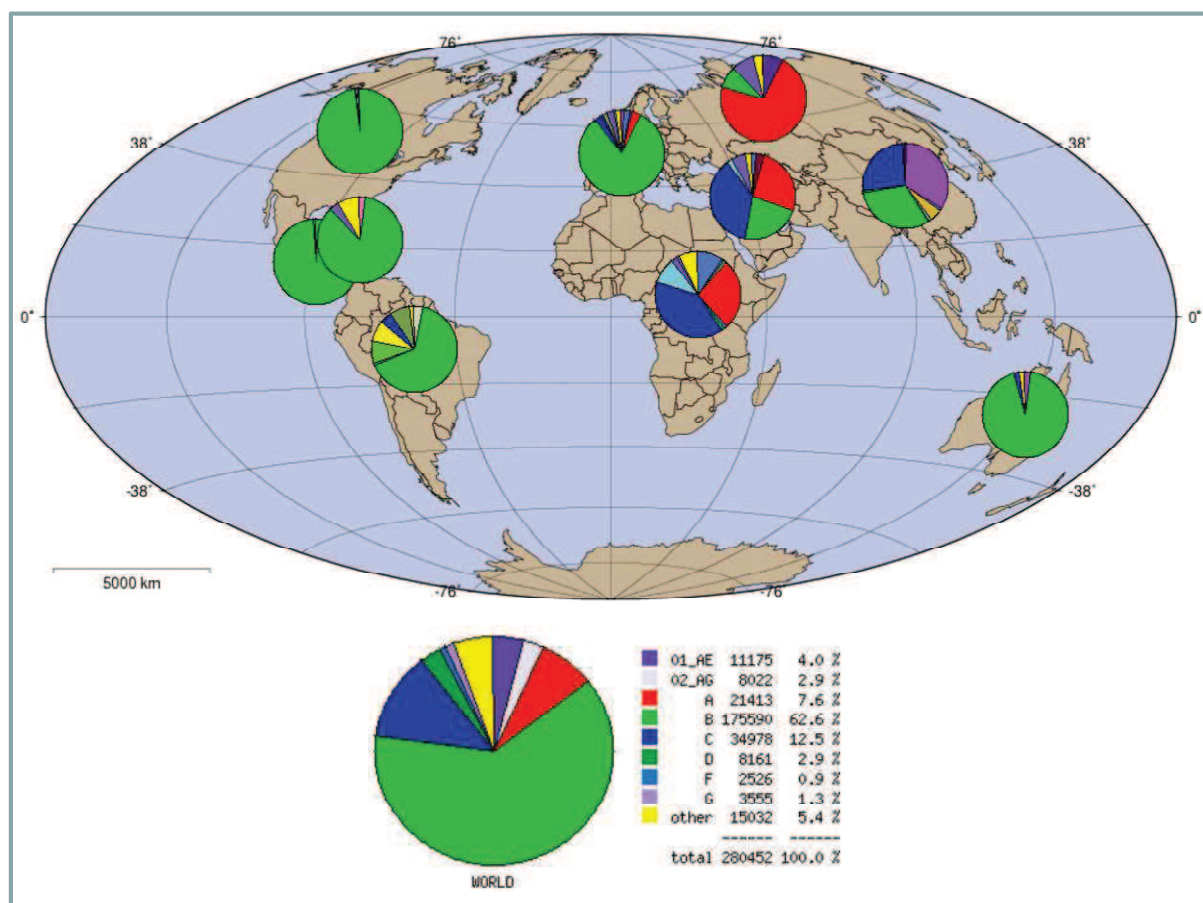


Figure 10 : Répartition géographique mondiale de toutes les séquences du VIH-1. Les différents sous-types et CRF (formes recombinantes circulantes) du VIH-1 groupe M ainsi que des VIH-1 groupe N et VIH-1 groupe O (<http://hiv-web.lanl.gov>).

Les virus VIH-1 sont actuellement classés en trois groupes : le groupe M (principal responsable de la pandémie), le groupe O (outlier) et le groupe N (non-M non-O). Le groupe M est actuellement subdivisé en 9 sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J, K) et 37 formes recombinantes (CRF01-CRF37) (<http://hiv-web.lanl.gov>) (cf. figure 10). Le sous-type A est subdivisé en sous-type A1, A2 et plus récemment A3 et A4 [187]. Le sous-type F est lui-même subdivisé en sous-sous-type F1 et F2.

Parmi les CRF, les plus connues et fréquemment retrouvées sont le CRF01-AE (recombinaison entre les virus de sous-type A et les virus de sous-type E, virus probablement ancestral mais non décrit à ce jour) responsable d'une partie de l'épidémie en Asie, et le CRF02-AG (recombinaison entre les virus de sous-type A et les virus de sous-type G) responsable de l'épidémie en Afrique de l'Ouest.

La répartition géographique des différents VIH-1 diffère selon l'ancienneté de l'épidémie dans le pays, l'effet fondateur dans le groupe d'individus considéré et selon les migrations de population. Dans les pays du Nord, le sous-type B est prédominant et il est responsable de l'épidémie initiale dans les pays industrialisés, en particulier l'Amérique du Nord et l'Europe de l'Ouest. Par contre, à l'échelle mondiale, les VIH-1 non-B représentent au moins 90 % des virus circulants [188]. Les sous-types prédominants sont le sous-type C, responsable de 50 % des infections, principalement en Afrique du Sud et en Asie, le sous-type A et le sous-type D en Afrique de l'Est, le CRF02-AG en Afrique de l'Ouest et le sous-type B (12 %) en Amérique du Nord et en Europe. En Afrique centrale circulent les différents groupes du VIH-1 (M, N et O), l'ensemble des sous-types du groupe M et la majorité des formes recombinantes.

En France, est observée une évolution de l'épidémie puisque, pour les patients diagnostiqués au moment de leur primo-infection, la fréquence de virus VIH-1 de sous-type non-B est passée de 10 % durant les années 1999-2000 à 28 % pour les patients infectés en 2004-2006 [189-191]. Chez les patients nouvellement dépistés en France, quel que soit leur stade clinique, la proportion de ceux qui sont infectés par des virus non-B est de 50 % [192]. Deux phénomènes sont responsables de cette augmentation : une proportion plus importante de patients originaires d'Afrique sub-saharienne et une augmentation de la fréquence des virus non-B dans la population caucasienne, en raison de la mixité des populations. La moitié des virus non-B isolés en France sont des virus CRF02-AG, ce qui témoigne des liens existant entre la France et l'Afrique de l'Ouest [193, 194].

À la différence du VIH-1, un nombre limité de souches VIH-2 a été génétiquement caractérisé permettant une classification en 8 groupes (A-H), et seuls les groupes A et B jouent un rôle dans l'épidémie du VIH-2 qui reste limitée à l'Afrique de l'Ouest [174, 193].

2-2) Structure du VIH

En dehors d'une cellule humaine, le VIH existe sous forme de particules sphériques (parfois appelées virions). Le VIH est un petit virus enveloppé d'environ 80 à 120 nm de diamètre. Son enveloppe renferme une matrice, une capside et deux molécules d'ARN de polarité positive (cf. figure 11)

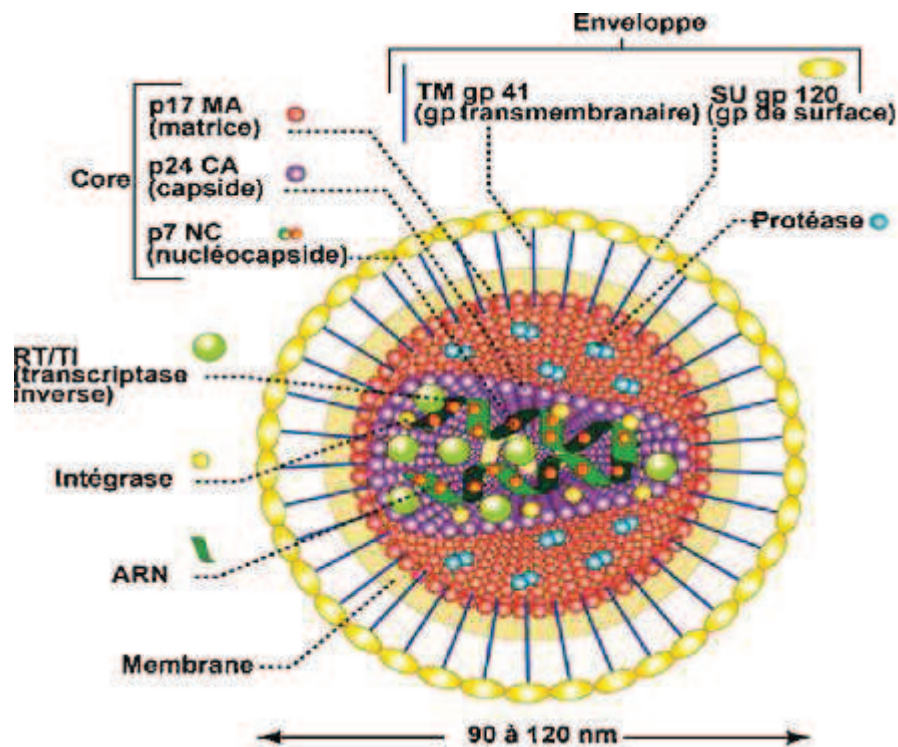


Figure 11 : Structure du VIH-1 (D'après J.M Huraux, Traité de virologie médicale)

2-2-1) Protéines de structure

Les glycoprotéines d'enveloppe, gp120 et gp41, sont associées de façon non covalente. La protéine gp41 est enchâssée dans une couche lipidique, formant avec elle l'enveloppe du virus. Lorsqu'une cellule est infectée par le VIH, elle présente à sa surface les protéines gp120 et gp41 provenant de l'expression du génome viral. Ainsi, quand un nouveau virus

bourgeonne et se sépare de la cellule, il emporte avec lui une partie de la membrane cellulaire et ces deux protéines.

La protéine gp120, de 120 kDa, interagit avec le récepteur CD4 des lymphocytes T. La glycoprotéine gp120 joue ainsi un rôle indispensable dans la pénétration du virus dans la cellule. Toutefois, l'engagement de CD4 avec gp120 est insuffisant pour une infection efficace qui nécessite l'implication des corécepteurs CXR4 et CCR5. La protéine gp120 interagit également avec le PRR de type lectinique, DC-SIGN, exprimé par les DC et les macrophages, ainsi qu'avec le PRR soluble MBL.

La protéine gp41 est une glycoprotéine transmembranaire de 41 kDa principalement impliquée dans la pénétration de la capsid virale dans la cellule hôte portant le peptide nécessaire à la fusion de la bicouche lipidique de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire.

Les protéines de la matrice MA (17 kDa) sont issues de la maturation de Gag. Elles tapissent la partie intracytoplasmique de l'enveloppe virale grâce à leur interaction, par leur groupement myristate, avec la membrane lipidique interne. Une région MA (54-68 aa) constituant l'hélice $\alpha 4$ [195, 196], est impliquée dans l'assemblage de la particule virale en permettant la formation des trimères MA [197].

Les protéines de la capsid CA (24 kDa) sont caractérisées par la présence d'une région majeure d'homologie MHR « Major Homology Region ». Ces protéines, constituent la capsid du virus mature, lui conférant une structure conique (Fields Virology, fifth edition, 2007 ; [198]).

Les protéines de la nucléocapsid NC (7 kDa) sont caractérisées par la présence de domaines en doigt de zinc de type CCHH [199]. Ces protéines sont flanquées par des séquences basiques directement impliquées dans la liaison avec les acides nucléiques [200, 201]. Ces motifs en doigt de zinc participent à l'encapsidation de l'ARN viral, et donc à son infectivité [202, 203].

2-2-2) Le génome du VIH

Constitué de deux copies linéaires d'ARN simple brin de polarité positive associées à deux molécules de transcriptase inverse et de l'intégrase, le génome du VIH possède neuf gènes. Trois gènes, *gag*, *pol* et *env*, codent respectivement pour les protéines enzymatiques et les protéines de structure de nouvelles particules virales ; et six autres gènes, *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu*, codant pour les protéines accessoires et de régulation (cf. figure 12) qui régissent

la capacité du VIH à infecter une cellule, à produire de nouvelles copies du virus ou à provoquer des maladies. La séquence « long terminal repeat » (LTR), présente aux deux extrémités de chaque brin de l'ARN viral, permet de contrôler la réplication virale.

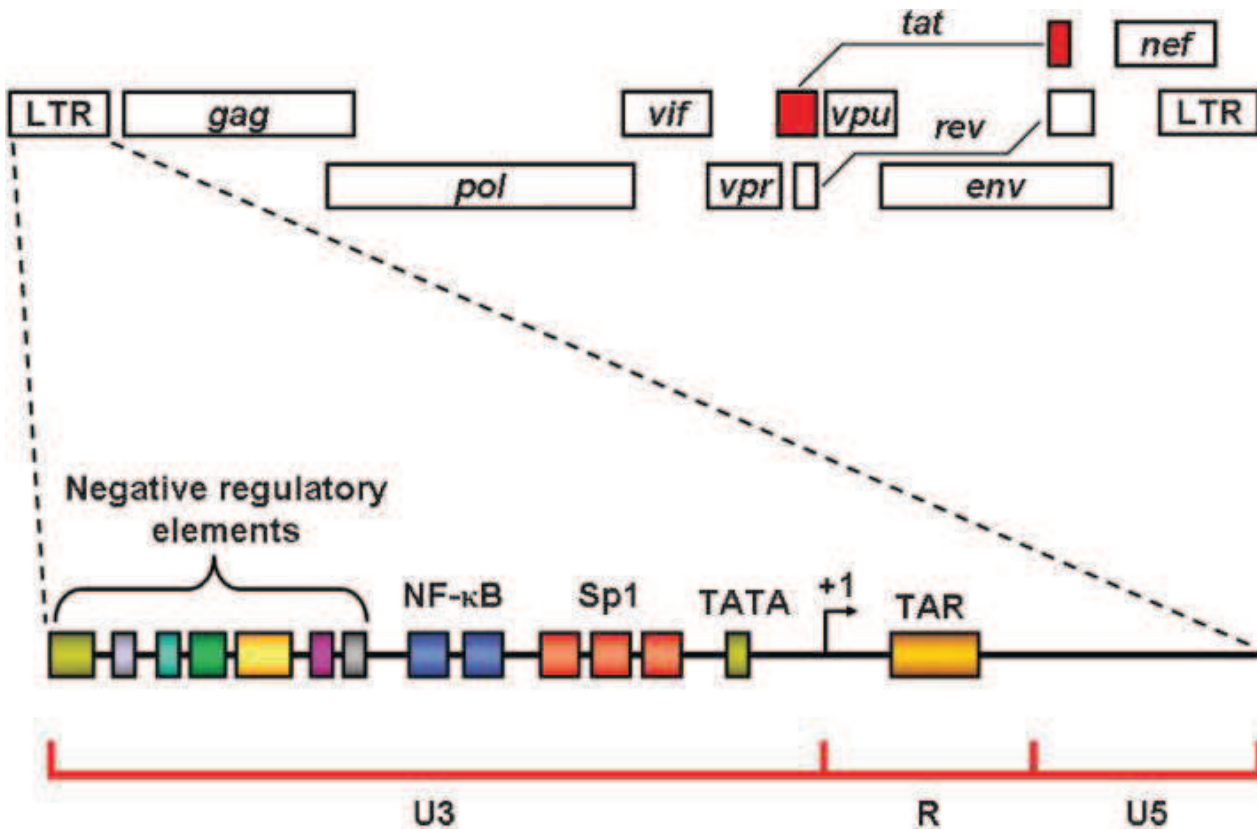


Figure 12 : Organisation du génome du VIH-1. Le LTR du VIH-1 contient plusieurs sites de liaison aux protéines dont certains sont des éléments régulateurs négatifs de la transcription du génome viral grâce à leur interaction avec les protéines de régulation. Le LTR viral contient également une boîte TATA, deux sites de liaison à NF-κB, trois répétitions en tandem du site de liaison à Sp1. Tat est codée par deux exons, le premier code les 72 premiers aa et le deuxième les aa 73-101. La protéine Tat recrute des facteurs de transcription afin de réguler positivement la transcription du génome viral (D'après [204])

En plus des protéines codées par le génome viral, on trouve entre autres un ARN de transfert (ARN^{tyrosine}) qui intervient comme amorce dans l'étape d'initiation de la rétrotranscription. On observe également la présence de la cyclophiline A qui contribue au repliement de la protéine Gag lors de l'assemblage des particules infectieuses. Au cours du bourgeonnement viral, certaines protéines de la membrane, telles que les molécules du CMH, sont insérées.

2-2-3) Protéines enzymatiques

Le gène viral *pol* code pour une macroprotéine précurseur p180 qui sera ensuite clivée en p66 et p51 (transcriptase inverse), p32 (intégrase) et p10 (protéase).

La transcriptase inverse a pour rôle principal de catalyser la synthèse de l'ADN à partir de l'ARN viral [205]. Cette enzyme est un hétérodimère composé de deux sous-unités p66 et p51 dotées d'une activité ADN polymérase capable d'incorporer les desoxyribonucléotides aussi bien sur l'ADN que l'ARN, et une activité RNase H ADN/ARN dépendante [206].

Généralement lente (1 à 100 nucléotides/seconde), l'activité ADN polymérase de la RT montre une faible fidélité (10^{-4} erreurs/base incorporée). Cette polymérase est incapable de corriger les bases erronées, contrairement à l'ADN polymérase de l'hôte. En effet, au moins une mutation par génome et par cycle de transcription inverse est introduite (Fields Virology, fifth edition, 2007). Ce manque d'édition de la RT est à l'origine de la forte variabilité observée chez le VIH-1. La RNase H est une exonucléase chargée de dégrader uniquement l'ARN sous forme hybride (ARN:ADN). Cette action permet l'obtention des oligonucléotides, de 6 à 10 résidus, grâce à l'activité ADN polymérase de la RT [207].

L'intégrase est une protéine de 32 kDa codée par le gène *pol* [208]. Son rôle est de catalyser l'insertion du génome viral dans le génome de la cellule hôte. La structure du site actif de l'intégrase appartient à la famille des polynucléotidyl-réductases. Cette protéine présente du côté N terminal un motif de type His-His-Cys-Cys (HHCC). Ce motif est indispensable à l'activité enzymatique, mais ne semble pas être impliqué dans la fixation de la protéine sur l'ADN.

La protéase PR est une petite protéine de 100 acides aminés appartenant à la famille des aspartyl-transférases. La protéase agit premièrement pendant ou immédiatement après la libération du virion. Cette première action lui permet d'être séparée de son précurseur Gag-Pol. Le clivage induit par la protéase, participant à la maturation des précurseurs Gag et Gag-Pro-Pol [209, 210], participe au changement de morphologie des virions et conduit à leur maturation.

2-2-4) Protéines de régulation et accessoires

Tat : Transactivateur de la transcription, la protéine Tat, localisée au niveau du nucléole, est codée par deux exons. Son rôle est d'induire la transcription virale, donc

d'augmenter l'efficacité de l'initiation de la transcription à partir du promoteur LTR [211]. Tat est une protéine de 14 kDa composée de six domaines dont chacun joue un rôle particulier au cours des différentes activités du facteur de transcription viral [212, 213]. Notons que, outre son rôle majeur dans la transcription virale, la protéine Tat peut être sécrétée par les cellules infectées et agit, comme telle, sur de nombreuses cibles cellulaires en diminuant l'expression des molécules du CMH, par exemple. Le rôle de Tat dans la réplication virale et, exogènement dans la régulation de nombreux gènes au sein des cellules non-infectées, sera détaillé dans le chapitre « la protéine Tat du VIH ».

Rev : Impliquée dans la régulation de l'expression des protéines virales, la protéine Rev est une phosphoprotéine de 19 kDa permettant l'export des ARNm viraux (non épissés ou mono-épissés) vers le cytoplasme pour leur traduction. Cette protéine peut faire des navettes entre le noyau et le cytoplasme [214, 215]. A noter que cette protéine est codée par 2 séquences éloignées l'une de l'autre (rev1 et rev2), comme Tat.

Nef : Facteur négatif, la protéine Nef joue un rôle fondamental dans la propagation du virus et l'évolution de l'infection vers le stade SIDA [216]. Au niveau des cellules infectées, elle diminue l'expression du récepteur CD4 et des molécules du CMH de classe I. Elle permet aussi, chez les individus infectés [217, 218], de maintenir une charge virale élevée.

Vif : Facteur d'infectivité viral, la protéine Vif permet une meilleure maturation des virions et un nombre réduit de particules virales défectueuses. Vif est impliquée dans la maturation ou l'assemblage des protéines de structure, et dans la stabilisation du complexe de pré-intégration [219]. Cette protéine est également impliquée dans de nombreux mécanismes au cours du cycle de réplication viral, tels que l'encapsidation [220, 221]. Vif est responsable de la dégradation, par le protéasome, du facteur antiviral APOBEC3G [222].

Vpr : La protéine Vpr facilite le transfert du complexe viral de pré-intégration (ou PIC) du cytoplasme de la cellule hôte vers son noyau. En effet, différentes fonctions sont attribuées à Vpr, entre autres la stimulation de l'expression génique à partir du LTR [223] et la facilitation du transport nucléaire du complexe de pré-intégration [224].

Vpu : La protéine Vpu n'est exprimée que chez le VIH-1. Chez VIH-2, Vpu est remplacée par Vpx qui assure des fonctions identiques. Vpu possède deux fonctions principales: elle facilite la libération des particules virales lors du bourgeonnement et permet la dégradation du CD4 et le transfert de gp160 vers la membrane [225].

2-3) Cycle de réplication viral

La réplication du VIH peut être décrite en quatre étapes principales : i) fusion et entrée du virus, ii) rétrotranscription et intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte, iii) transcription et traduction des ARNm viraux et iiiv) assemblage, bourgeonnement et maturation des particules virales nouvellement produites. Ces différentes étapes sont schématiquement représentées dans la figure 13.

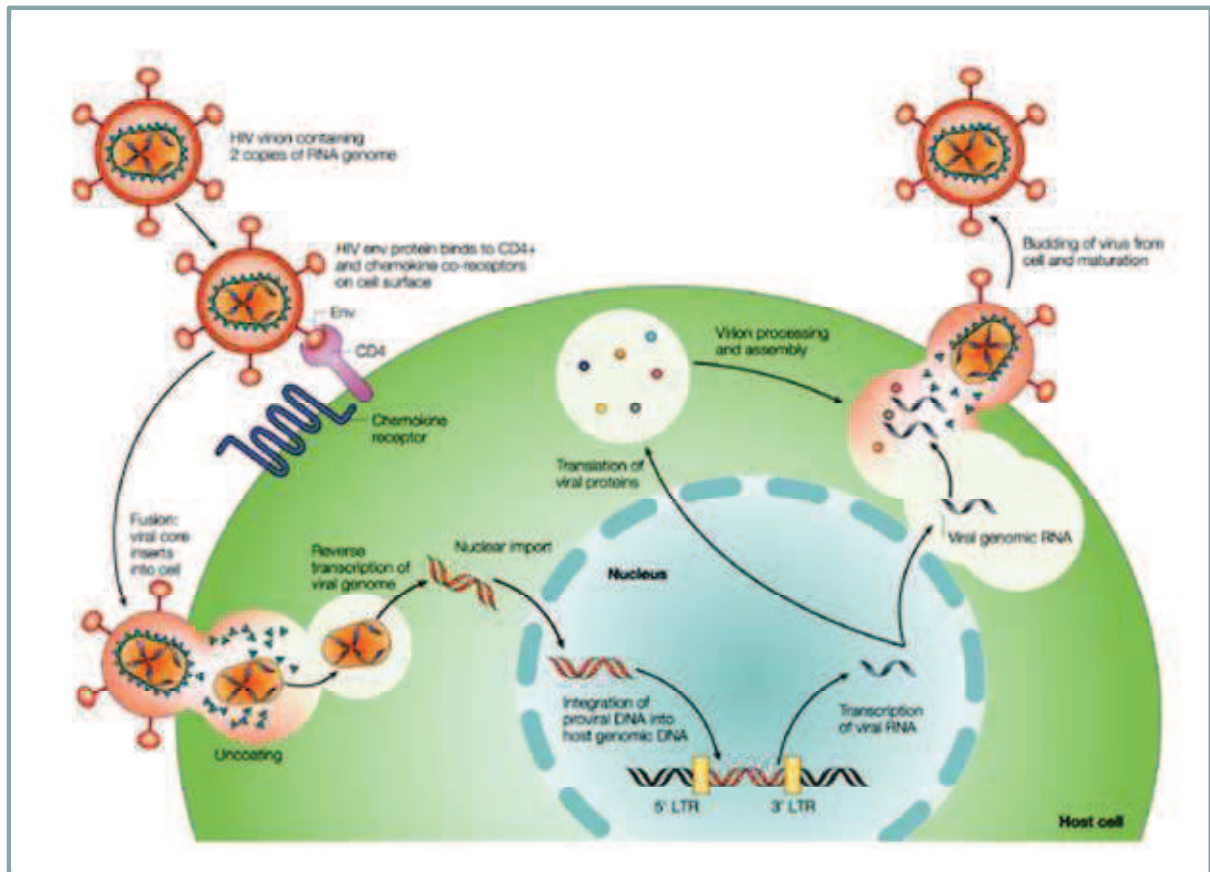


Figure 13. Principales étapes du cycle du VIH-1 (D'après [226])

Comme pour la plupart des rétrovirus, l'infection à VIH commence par l'interaction des protéines de l'enveloppe virale et des protéines exprimées à la surface de la cellule [227]. L'engagement de gp120, avec les récepteurs cellulaires, permet son association avec gp41. Cette association va induire un changement conformationnel de gp120 et le démasquage du peptide de fusion de gp41 facilitant l'engagement des corécepteurs au VIH pour une fusion des membranes virale et cellulaire aboutissant ainsi à l'entrée du virus dans la cellule hôte. [228]. Dans le cytoplasme, le VIH est décapsidé, et grâce à la transcriptase inverse, l'ARN viral est rétrotranscrit en ADN double brin linéaire. Le complexe de pré-intégration est

ensuite transporté vers le noyau au sein duquel il y a intégration de l'ADN double brin viral en vue de la formation du provirus [229] (cf. figure 13).

Dans le noyau, l'ARN polymérase II catalyse la transcription du provirus pour former les ARNm viraux ainsi que l'ARN génomique.

Les ARNm (épissés et non épissés) sont exportés du noyau afin d'être traduits en précurseurs de protéines virales.

Puis, viennent l'assemblage de la particule virale et l'empaquetage du génome viral [230].

Ainsi, après structuration, le virion est libéré et mûré pour générer une particule virale infectieuse. La maturation implique le clivage protéolytique, par la protéase virale, des précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol} pour générer les protéines mûres dans le virion infectieux.

2-4) Immunopathologie de l'infection à VIH

L'immunopathologie du VIH est caractérisée par trois phases distinctes : la phase de primo-infection (ou phase aigüe), la phase chronique (ou asymptomatique) et la phase SIDA (cf. figure 14).

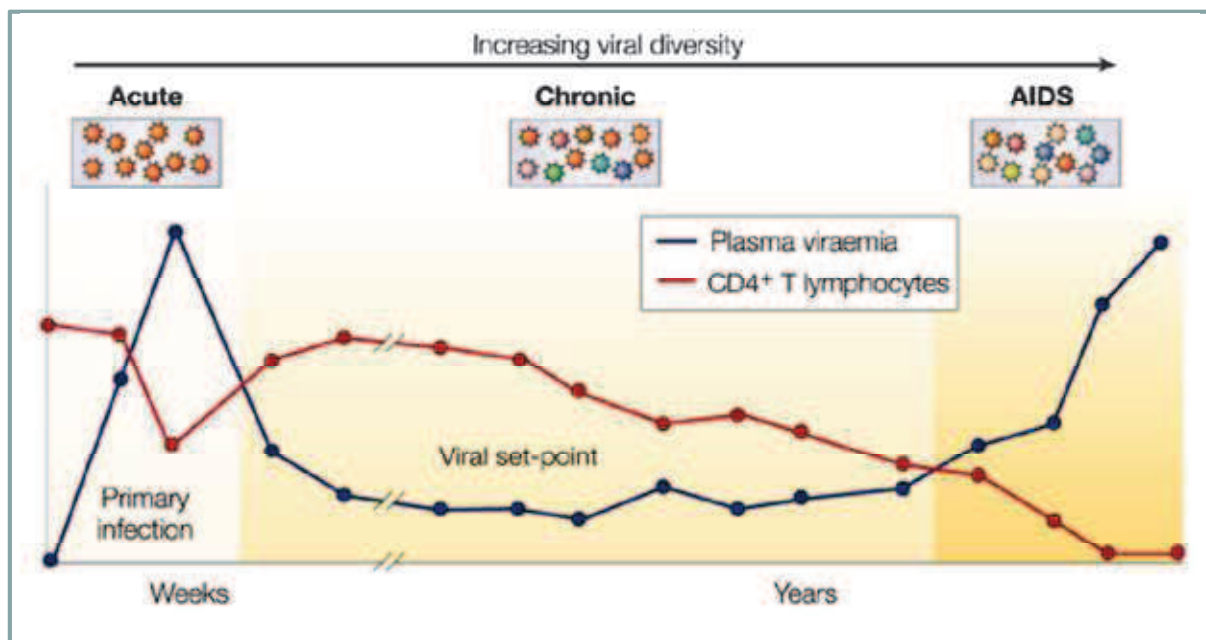


Figure 14 : Différentes phases de l'immunopathologie liée au VIH. L'infection primaire est généralement associée à des symptômes cliniques du syndrome rétroviral aigu. Après les premiers mois suivant l'infection, la virémie plasmatique se stabilise et le nombre de cellules T CD4⁺ se normalise. La phase chronique prolongée est cliniquement silencieuse, malgré la réplication virale permanente à des niveaux élevés. Le SIDA est caractérisé par la survenue d'infections opportunistes ou de tumeurs malignes associées au VIH-1. Le risque des maladies opportunistes augmente, de façon significative, lorsque le nombre des cellules T CD4⁺ tombe sous les 200 cellules/mm³. La diversité virale augmente en conformité avec le niveau toujours élevé de la réplication virale et de la nature d'erreurs de la transcription inverse. (D'après [231]).

2-4-1) La phase de primo-infection

Après infection, le VIH atteint rapidement les nodules lymphatiques et stimule aussi bien la réponse immunitaire humorale que cellulaire. Cette activation se traduit par un nombre

de plus en plus important de cellules infectées, par une production massive du virus ($10^6 - 10^8$ copies d'ARN par ml), ainsi qu'une chute de globules blancs (leucopénie) et des lymphocytes T CD4+ [232-235]. Deux à quatre semaines après infection, une grande partie du virus est éliminée grâce entre autres aux réponses cellulaires T CD8+ et T CD4+ [236, 237] et des anticorps spécifiques du VIH-1, permettant ainsi une remontée du nombre de lymphocytes T CD4+ (cf. figures 15 & 16). Cependant, le contrôle de la charge virale n'est pas total car elle reste détectable tout au long de la maladie. Cette phase est souvent accompagnée de symptômes, non persistants et pouvant passer inaperçus, tels que fièvre, céphalées, myalgies. La sévérité et la durée de ces symptômes ont une valeur pronostique. Le développement de symptômes coïncide avec une virémie plasmatique élevée ayant pour origine une intense réplication du virus dans les organes lymphoïdes [238].

Plusieurs travaux ont montré qu'une des caractéristiques de la phase de primo-infection est l'infection et la déplétion massive des lymphocytes T CD4+ CCR5+ des muqueuses, et en particulier de l'intestin [239-243].

Le rôle de la réponse immunitaire humorale dans le contrôle initial de la réplication virale reste controversé. Les anticorps neutralisants ne sont détectés qu'à partir de 1 à 2 mois post-infection [244] (cf. figures 15 & 16), c'est-à-dire après le contrôle initial de la réplication virale [245]. La majorité des virus isolés lors de la primo-infection sont des isolats R5 et les virus X4 n'apparaissent que plus tard dans l'infection. L'amplitude de la réplication virale au cours de cette phase conditionne largement la rapidité d'évolution vers la maladie [246-248]. Les événements majeurs survenant au cours de cette phase sont résumés dans les figures 15-17.

2-4-2) La phase chronique (ou asymptomatique)

Pendant cette phase, malgré l'endommagement continu du système immunitaire, les sujets infectés restent asymptomatiques. La chronicité de l'infection à VIH peut durer en moyenne 10 ans [234, 249-251]. Au cours de cette phase, le virus subit des mutations qui lui permettent d'échapper à la pression immunitaire de l'hôte et continue à se répliquer dans les organes lymphoïdes. Cette étape est principalement caractérisée par une chute progressive du nombre et de la fonction des lymphocytes T CD4+ dans le sang et un faible pourcentage des cellules infectées. En revanche la perte de fonction des cellules T CD4+ se fait

progressivement. En effet, les cellules T perdent la capacité de réponse aux antigènes, puis aux alloantigènes et enfin aux mitogènes non spécifiques [252, 253].

Cette phase est également caractérisée par une activation immunitaire généralisée qui serait responsable de la disparition de l'ensemble des cellules CD4+. L'activation des lymphocytes T CD4+ génère un environnement propice à la réplication virale, conduisant à une augmentation du potentiel de destruction du système immunitaire. Cet état d'activation conduit à la consommation des réserves de cellules T naïves et mémoires au repos [254]. De plus, l'activation chronique et la prolifération des lymphocytes T qui s'en suit perturbent le contrôle du cycle cellulaire, augmentant ainsi la propension à l'apoptose induite par l'activation [255]. Cependant, la déplétion des cellules T ne survient pas uniquement à cause de leur infection directe mais aussi du fait de leur sensibilité aux effets délétères de l'activation généralisée du système immunitaire et de leur renouvellement inefficace.

Pendant la phase asymptomatique, le virus est présent non seulement dans les organes lymphoïdes mais aussi dans d'autres organes comme le système nerveux central et le tractus génito-urinaire [177].

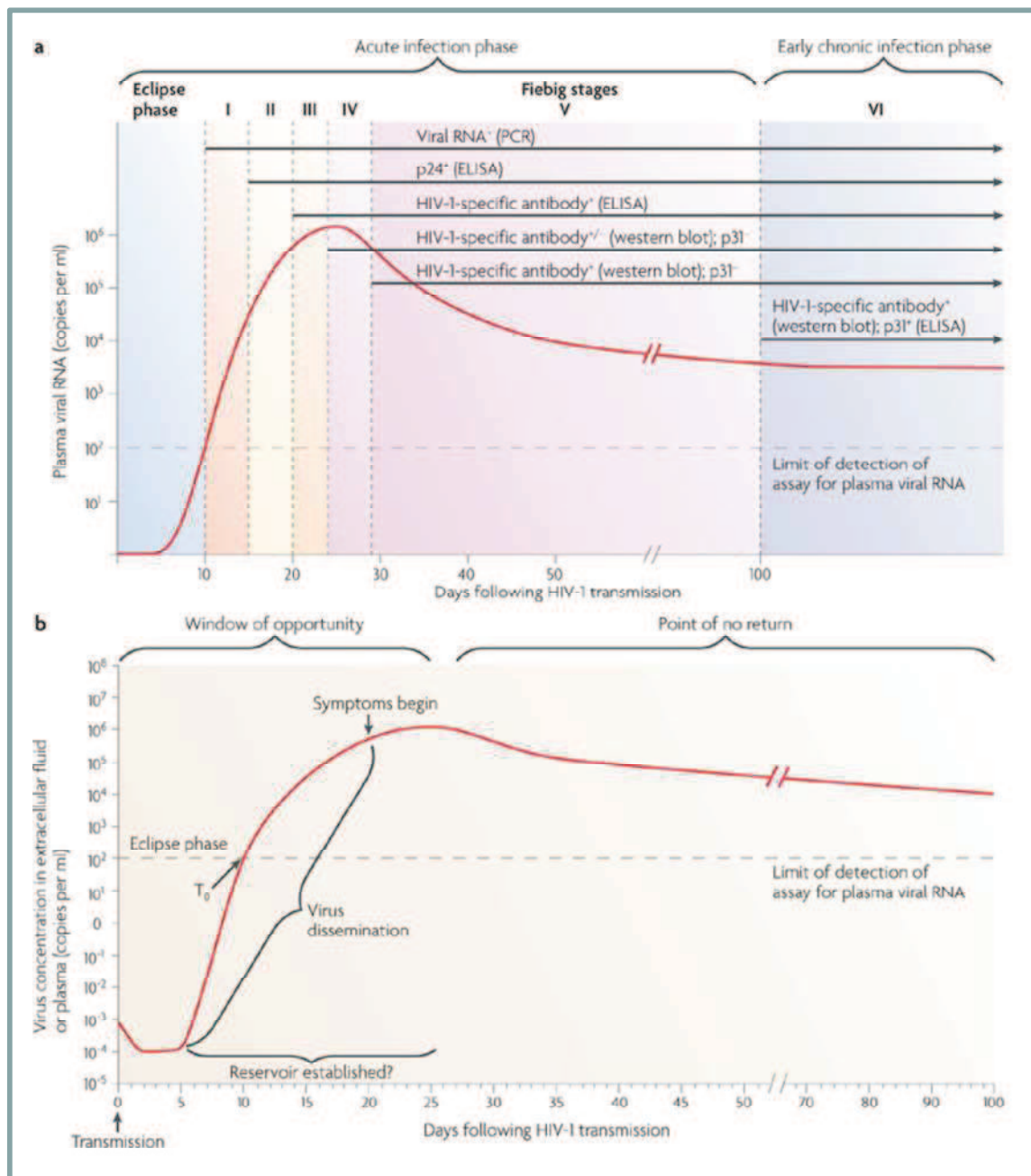
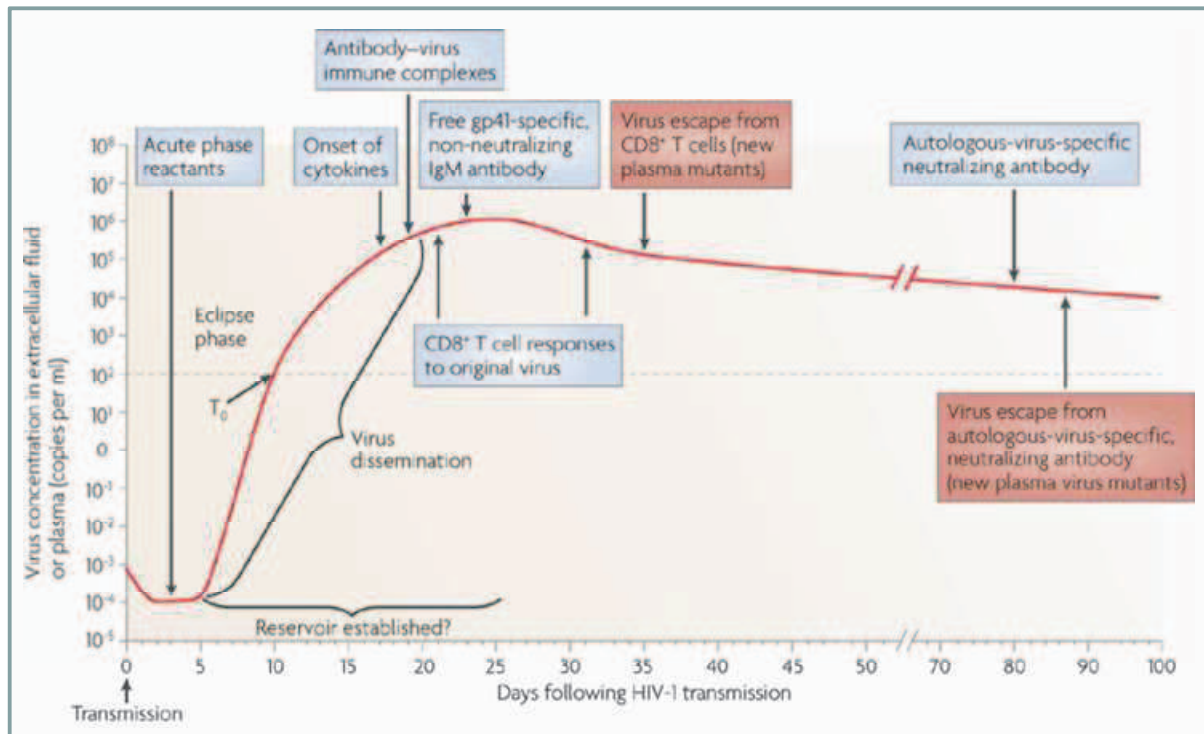


Figure 15 : Définition de l'immunopathologie de l'infection à VIH-1. (a) Les premières semaines suivant l'infection peuvent être divisées en phases cliniques selon la détection des antigènes et anticorps spécifiques du VIH-1. La phase d'éclipse correspond au temps écoulé entre l'infection et la première détection de l'ARN viral dans le plasma. Au bout de 21 à 28 jours après infection, les niveaux plasmatiques viraux atteignent leur maximum. Les étapes de Fiebig (I-VI) sont caractérisées par le diagnostic clinique du matériel lié au virus (ARN viral par PCR, antigènes viraux p24 et p31 par ELISA, anticorps spécifiques du virus par ELISA ou Western blotting). (b) Résumé des événements fondamentaux survenant au cours de la phase aiguë de l'infection à VIH-1. (D'après [256]).



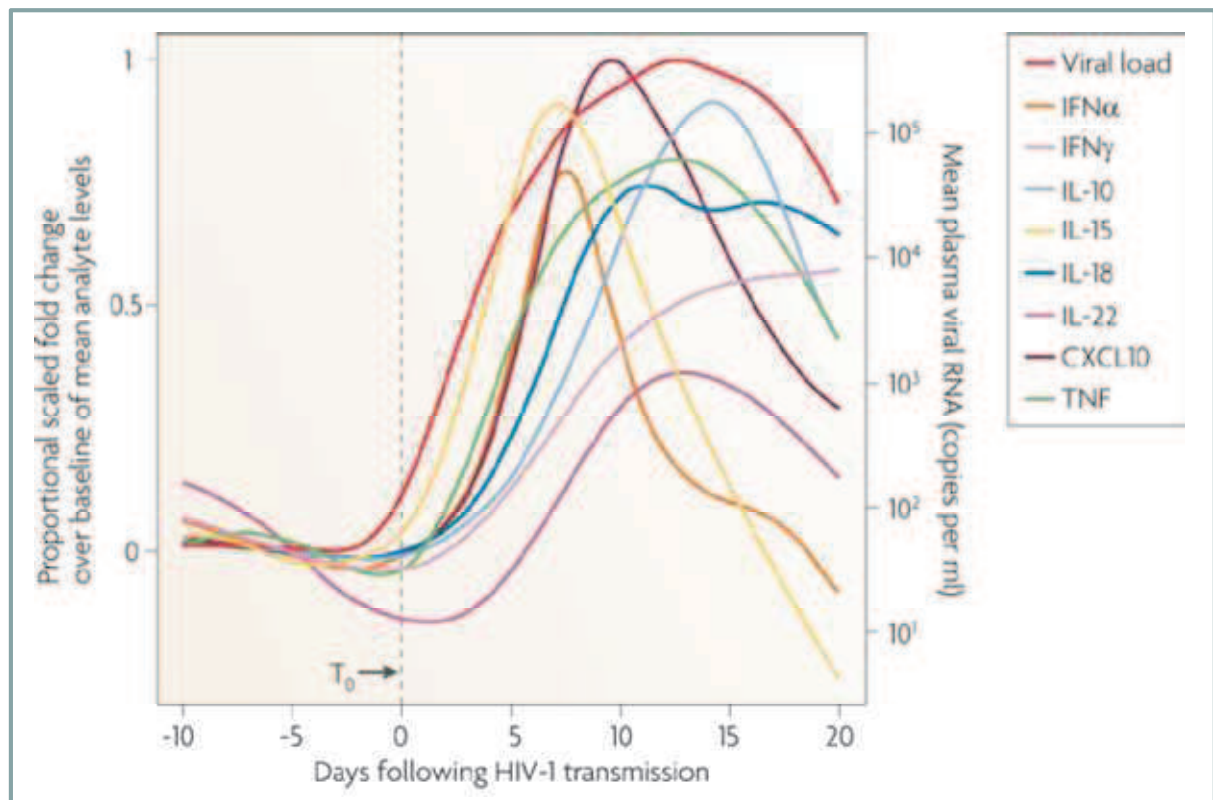


Figure 17 : Taux plasmatiques de cytokines au cours de la phase aigüe de l'infection à VIH-1. La cinétique relative d'augmentation, dans le plasma, des protéines, cytokines et chimiokines de la phase aigüe de l'infection à VIH-1. La première vague est caractérisée par l'augmentation de l'IL-15 et l'IFN α ; puis par la seconde vague constituée de TNF, l'IL-18 et l'IL-10. (D'après [256]).

2-4-3) La phase SIDA

L'apparition du SIDA correspond à un épuisement du système immunitaire devenu incapable de contrôler les mutants d'échappement, avec pour conséquence principale une réplication intense du VIH. La chute progressive du nombre et de la fonction des cellules T CD4⁺ résulte en une très forte diminution de la production de certaines cytokines, telles que l'IL-2, responsable de la baisse de l'activité anti-VIH des cellules CD8⁺. A ce stade, les isolats primaires ont changé de phénotype. Un certain nombre d'hypothèses ont été évoquées pour expliquer cette conversion de phénotype. Une des plus triviales est la disparition des cellules CD4⁺CCR5⁺, conditionnant la sélection de virus se répliquant dans les cellules CD4⁺CXCR4⁺. Ces virus sont retrouvés chez au moins 50% des patients au stade SIDA. Ce passage de virus R5 à des virus X4 est connu sous le nom de conversion phénotypique, et

indique un mauvais pronostic pour le patient [257-259]. Le SIDA est ainsi déclaré lorsque le nombre de cellules T CD4⁺ atteint un seuil inférieur ou égal à 200 cellules/ μ l, faisant très souvent suite à l'apparition des infections opportunistes ou de tumeurs malignes associées au VIH.

3. La protéine Tat du VIH

3-1) Gène et structure protéique

Tat est une petite protéine nucléaire de 14 kDa, codée par deux exons (1-72 et 73-101), qui existe sous deux formes prédominantes, 86 et 101 acides aminés, [260]. La forme longue est prépondérante dans la plupart d'isolats cliniques de tous les sous types du VIH-1, excepté le sous type D présentant un polymorphisme nucléotidique qui crée un codon stop dans le second exon. Cependant, il a été montré que certains isolats viraux de sous type B possèdent cette forme tronquée de Tat qui reste la plus utilisée en recherche [260, 261]. Tat est une protéine flexible dont les changements structuraux nécessaires, interviennent probablement au cours d'interactions avec ses cibles pharmacologiques et surtout avec ses partenaires biologiques indispensables à sa fonction [262, 263].

3-1-1) Structure primaire

Le gène codant Tat est organisé en deux exons. Le premier exon est organisé en deux domaines majeurs : le domaine d'activation qui interagit avec de nombreuses protéines cellulaires, dont la cycline T1 ; et le domaine basique composé principalement d'arginine et de lysine. Cet exon suffit à induire la transactivation in vitro, mais le second exon est indispensable pour observer le phénomène in vivo [264]. Des travaux montrent que Tat peut subir jusqu'à 40% de variation de séquence et rester active [265].

Tat est divisée en six domaines fonctionnels: le domaine riche en prolines, le domaine riche en cystéines, le domaine « cœur », les domaines riche en arginines et en glutamines et le domaine d'adhésion cellulaire (cf. figure 18). Le domaine I (résidus 1 à 21) est une région riche en proline possédant le tryptophane en position 11 conservé. La région II (résidus 22-37) contient sept cystéines bien conservées. Cette caractéristique n'est pas valable pour le sous type C qui porte une mutation C31S. Il a été montré que la protéine Tat fonctionnelle a ses cystéines fixées au zinc [266]. Cependant, d'autres études montrent des résultats similaires avec un peptide de Tat ne renfermant pas le domaine riche en cystéines [267]. De plus, d'autres travaux ont montré par ailleurs que la transactivation avec des variants de Tat synthétiques ne nécessite pas une fixation au zinc [268]. La région III (résidus 38 à 48), ou

région core, est caractérisée par la conservation d'une phénylalanine en position 38 et de la séquence LGISYG. Le domaine IV (résidus 49 à 57) est une région riche en résidus basiques. Les résidus 58 à 72 constituent la région V, riche en glutamine. Cette région possède le taux de variation de séquence le plus élevé. Enfin, la région VI, constituant la partie C terminale de Tat codée par le second exon, héberge le motif RGD commun aux sous-types viraux B et D [260].

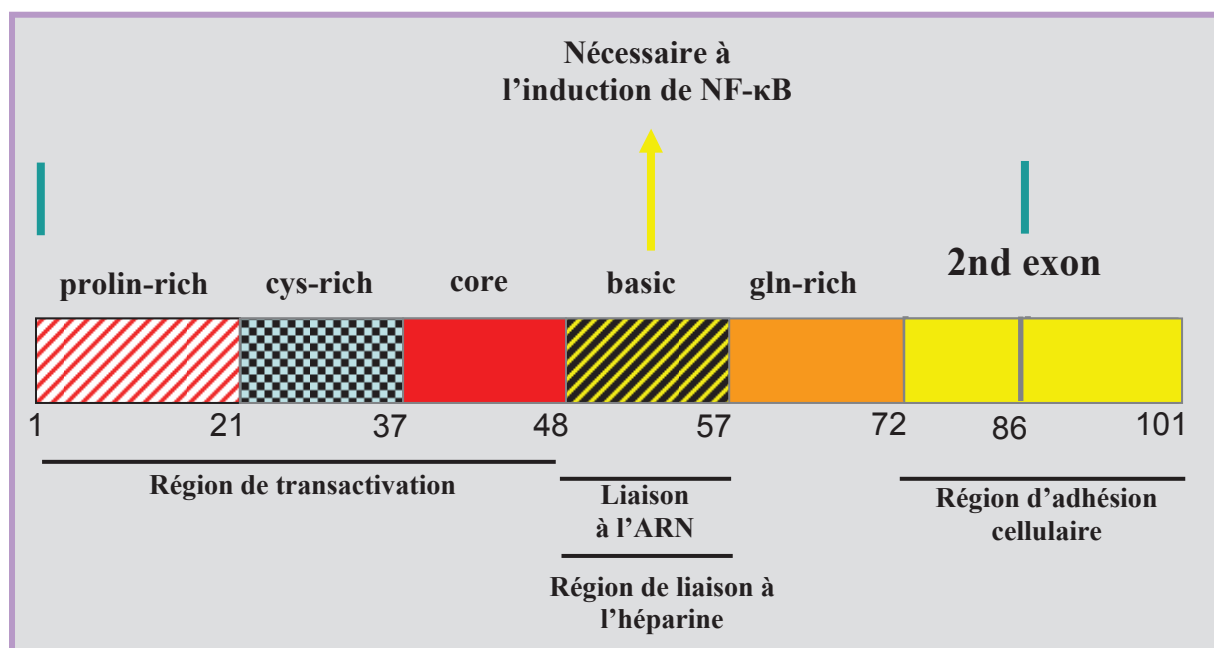


Figure 18 : Domaines fonctionnels de la protéine Tat du VIH-1

Le domaine basique est impliqué dans la plupart des fonctions de Tat [269]. Les études par résonance magnétique nucléaire (RMN) des variants de Tat biologiquement actifs montrent que la région basique et les autres régions fonctionnelles sont bien exposées aux solvants [264, 270, 271]. Au sein de ces régions le tryptophane en position 11 est fortement conservé et, jouerait un rôle structural encore peu caractérisé aujourd'hui [262, 272]. Ce repliement est similaire entre les différents variants de Tat en solution aqueuse, mais il peut radicalement changer en cas d'exposition à des solvants hydrophobes [268]. Le domaine basique de Tat intervient dans la localisation nucléaire [273, 274] et la fixation à l'élément TAR de l'ARN génomique viral qui, s'étendant du site d'initiation de la transcription à +57, permet une structure secondaire stable de l'ARN pour des niveaux d'expression élevés du génome viral et une réplication efficace du VIH [275]. Le domaine basique faciliterait également d'autres activités de Tat, tels que : la transduction membranaire [276], le soutien de

la transcription virale [277], et la potentialisation de l'interaction avec le récepteur d'intégrine [278].

3-1-2) Structure secondaire

Les structures secondaires de Tat dépendent de son environnement, et changent donc très fortement au contact de solvants hydrophobes, devenant principalement des structures secondaires en hélice α [268]. Ces changements montrent que Tat est hautement flexible. Cette flexibilité conférerait à la protéine virale la capacité de traverser les membranes cellulaires. Comme la protéine native, les peptides correspondant aux différents domaines de la séquence de Tat montrent la même capacité de changement selon l'environnement [279]. Cependant, les domaines I et VI de Tat sont peu flexibles, probablement du fait de leur contenu en proline très important. Au contraire, seul le domaine III est capable d'adopter une structure en coude β indépendamment des autres domaines. Il faut également noter que la modification chimique d'une des sept cystéines du domaine II produit des changements structuraux significatifs [280].

La principale structure secondaire des variants de Tat est en coude β [264, 270, 271]. Le cœur de la protéine Tat est principalement composé de résidus aromatiques organisés en un agrégat hydrophobe impliquant le tryptophane 11 et la phénylalanine 38 hautement conservés [264, 270]. Cet agrégat inclut également une partie de la région I. La région centrale serait impliquée dans le processus qui survient pendant l'internalisation de Tat et qui nécessite certainement un changement structurel adapté à cet environnement hydrophobe. Les mêmes travaux montrent que la région basique adopte une structure étendue, alors que les régions II, III, V et VI sont en coude β , sauf pour la variante Tat Mal qui possède une hélice α dans la région V. Ces études de spectre sur les variants de Tat par RMN montrent une structure flexible de la protéine virale qui serait un pré-requis pour sa capacité à franchir les membranes.

3-1-3) Structure tertiaire

La première étude structurale par RMN a été réalisée avec la variante Tat Z2 de 86 acides aminés en présence de l'agent réducteur, le dithiothreitol [212] (DTT). L'état d'oxydation des cystéines de la région II de Tat est un indicateur important de la fonctionnalité de la protéine virale. En effet, la protéine Tat devient inactive lorsqu'elle est incubée avec de fortes doses

d'agents réducteurs comme le DTT ou le 2-mercaptoethanol [280]. Des études, de structure 3D par RMN, des variants de Tat (Tat Bru, Tat Eli ou Tat Mal) ont montré que le spectre de dichroïsme circulaire en conditions non réductrices est similaire à celui obtenu avec Tat Z2 (cf. figure 19).

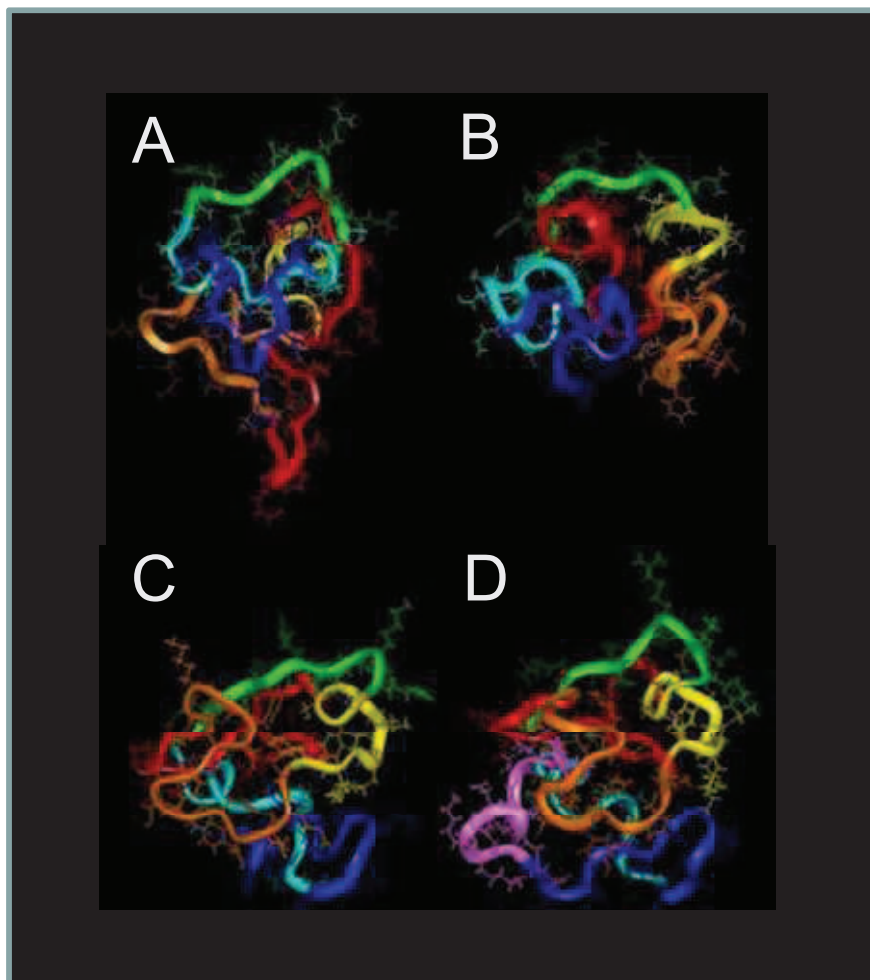


Figure 19 : Structure 3D des variants de Tat. Les structures des variants Tat Z2 (A), Tat Bru (B), Tat Mal (C) et Tat Eli (D) ont été obtenues par résonance magnétique nucléaire (RMN). Les régions de Tat (I à VI) sont représentées en rouge, orange, jaune, vert, bleu clair et bleu, respectivement. Et les résidus supplémentaires à l'extrémité Cter de Tat Eli sont représentés en rose. Le variant A a été chimiquement modifié, alors que les trois autres (B, C et D), biologiquement actifs, affichent un repliement similaire (D'après [281]).

Certaines des études structurales faites sur les variants de Tat, en considérant l'activité biologique, montrent que les différents variants ont une conformation similaire en solution aqueuse. Cette conformation est caractérisée par une poche hydrophobe, composée en partie de la région I, entourée par les autres régions qui sont bien exposées au solvant. Et que les

mutations observées, entre variants de Tat de différents sous types de VIH-1, induisent les variations structurales.

Toutefois, il est important de noter que de nombreux autres travaux ont montré que la protéine Tat est non structurée en solution à pH acide ou neutre ; et que le tryptophane 11 ne serait pas contenu dans un cœur hydrophobe [212, 262, 282].

3-1-4) Structure quaternaire

Une étude majeure très récente a mis en évidence des changements structurels de la protéine Tat lorsque cette dernière est liée au complexe P-TEFb (constitué de la cycline T1 et la kinase CDK9) [283]. En effet, cette étude montre que la protéine Tat acquiert une conformation étendue lorsqu'elle est surtout associée à la cycline T1. Il est également montré que lorsque Tat est liée à P-TEFb et à deux ions zinc son domaine d'activation acquiert une structure bien ordonnée [283] (cf. figure 20). A l'inverse, la protéine Tat induit également des changements structurels importants sur le complexe P-TEFb lui conférant une meilleure efficacité au cours du processus transcriptionnel [331].

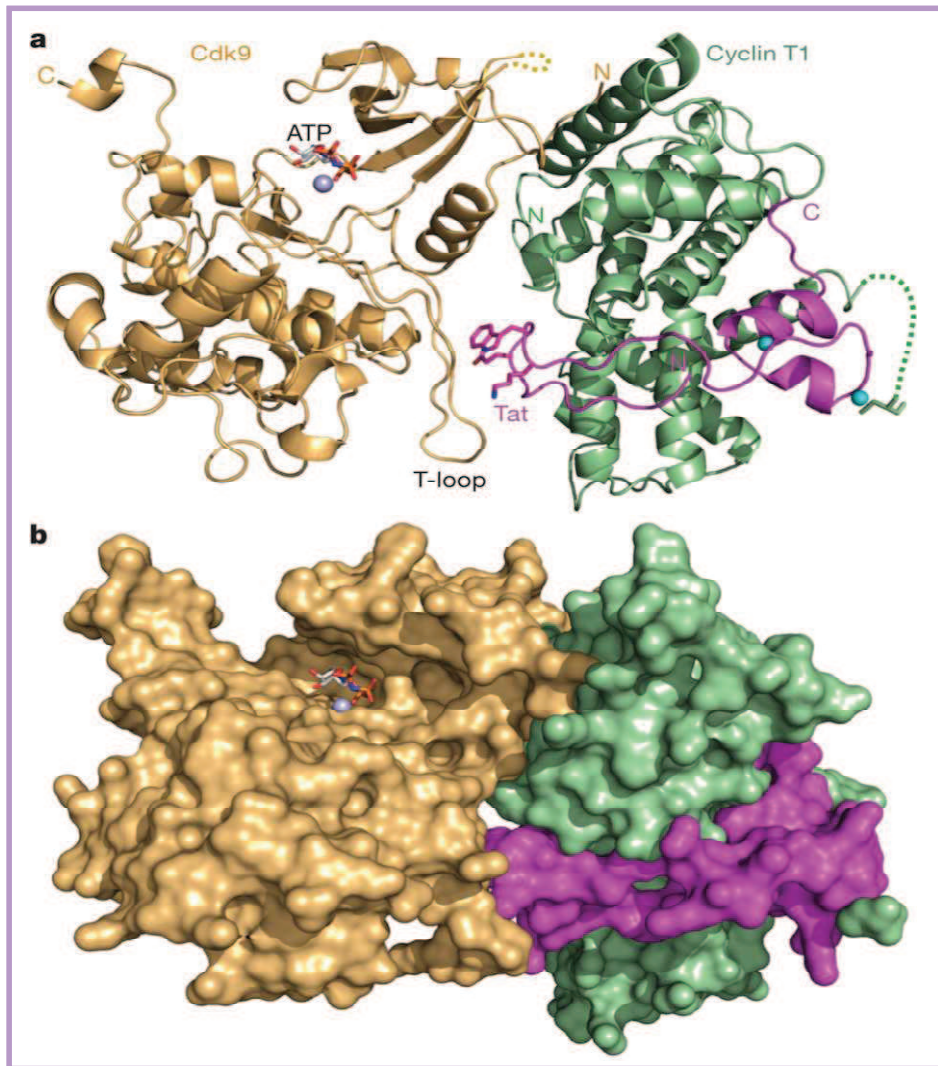


Figure 20 : Vue d'ensemble de la structure du complexe Tat/P-TEFb/ATP. Représentation en ruban **(a)** et représentation de surface **(b)** de la structure du complexe Tat/P-TEFb/ATP. Cdk9 est en orange clair, la cycline T1 en vert pâle et Tat en magenta. Les chaînes latérales des résidus de Tat interagissant avec Cdk9, la cystéine 261 (Cys 261) de la cycline T1 et l'analogue de l'ATP sont représentés sous forme sticks. Les atomes de zinc et de magnésium sont respectivement représentés en sphères azur et bleu clair. Les lignes en pointillés représentent le chaînon manquant entre la lysine 88 (Lys 88) et la glycine 97 (Gly 97) de Cdk9, et entre la leucine 252 (Leu 252) et la cystéine 261 (Cys 261) de la cycline T1. (D'après [496])

3-2) Tat intracellulaire

Tat est une protéine régulatrice du VIH produite très tôt après infection. Tat est nécessaire pour l'expression génomique virale, la transmission du virus de cellule à cellule, ainsi que pour la progression de la maladie [284, 285]. En effet, le gène *tat* du VIH-1 est composé de deux exons qui codent pour une protéine de 86 à 101 acides aminés selon les isolats (130 aa pour VIH-2). L'isolat LAI/Bru du VIH-1 code une protéine de 86 aa du fait de l'apparition prématurée d'un codon stop au niveau du 2^{ème} exon. Pendant la dernière étape du cycle viral, une Tat tronquée (72 aa pour VIH-1 et 99 aa pour VIH-2) est produite. Cette Tat est codée uniquement par le premier exon et générée lors de l'export cytoplasmique des ARN non épissés par la protéine Rev.

3-2-1) Rôle de Tat dans la transcription du génome viral

Plusieurs fonctions sont dédiées à la protéine Tat, notamment le remodelage de la chromatine, la phosphorylation de l'ARN polymérase II impliquée dans la transcription des ARNm viraux complets, la transactivation des gènes viraux et la fixation à une structure spécifique des ARNm viraux [286-288]. Cependant, ces différents rôles de la protéine Tat s'inscrivent dans une cascade séquentielle dont le but est la transcription du génome viral. En l'absence de Tat, l'expression du VIH est limitée par les barrières cellulaires qui inhibent la transcription efficace des ARNm. En effet, Tat recrute des protéines cellulaires pour pallier la répression du LTR viral, permettant ainsi d'induire l'expression des gènes viraux [286, 289]. Tat recrute différentes histones acétyltransférases (HATs), tel que le complexe CBP/p300, pour acétyler les nucléosomes en vue de pallier la répression du LTR viral. Cette action de Tat permet, non seulement la levée de la répression du promoteur viral, mais surtout une transcription plus efficace du génome viral par l'ARN polymérase II [289, 290]. Des études *in vitro* ont montré que Tat induit le changement de conformation du complexe CBP/p300, permettant ainsi une meilleure interaction de celui-ci avec les facteurs de transcription basale, telle que la protéine liant TATA et le facteur de transcription IIB [290, 291]. En retour, la lysine 28 du domaine d'activation de Tat, essentiel à la transcription et à la réplication virales, est acétylée par le facteur associé au complexe protéique CBP/p300 (PCAF) [292].

En conséquence, en l'absence de Tat ou de signaux d'activation cellulaire, l'efficacité de l'ARN pol II est réduite de façon dramatique, ce qui résulte en une production de courts transcrits viraux inachevés [293, 294]. Tat se fixe à la structure TAR située à l'extrémité 5' de

tous les transcrits viraux initiés. Tat recrute également le complexe P-TEFb composé de la cycline T1 et de la kinase CDK9 [295] (cf. figure 21). Le complexe P-TEFb, en effet, phosphoryle les résidus sérine du domaine C terminal de l'ARN Pol II. Ces événements potentialisent la polymérase en vue de la synthèse des transcrits viraux de taille complète [293]. Outre le complexe de l'ARN Pol II, la phosphorylation d'autres facteurs de transcription, tels que Sp1, CREB, eIF2 α et NF- κ B, sont également ciblés par la protéine Tat [296-299]. Le rôle de Tat dans la transcription du génome viral est consigné dans la figure 21.

Bien qu'aucune étude n'ait montré jusqu'ici l'incorporation de Tat dans les virions de VIH-1, Il est toutefois surprenant de constater que les variants du VIH-1 portant les gènes *tat* mutés sont incapables d'assurer la rétrotranscription efficace de leur ARN génomique. L'analyse biochimique de ces virus montre des niveaux de type natif de la rétrotranscriptase (RT), de l'ARN génomique et des protéines Gag et Env [300]. Ce qui suggérerait une implication de Tat au cours de la rétrotranscription.

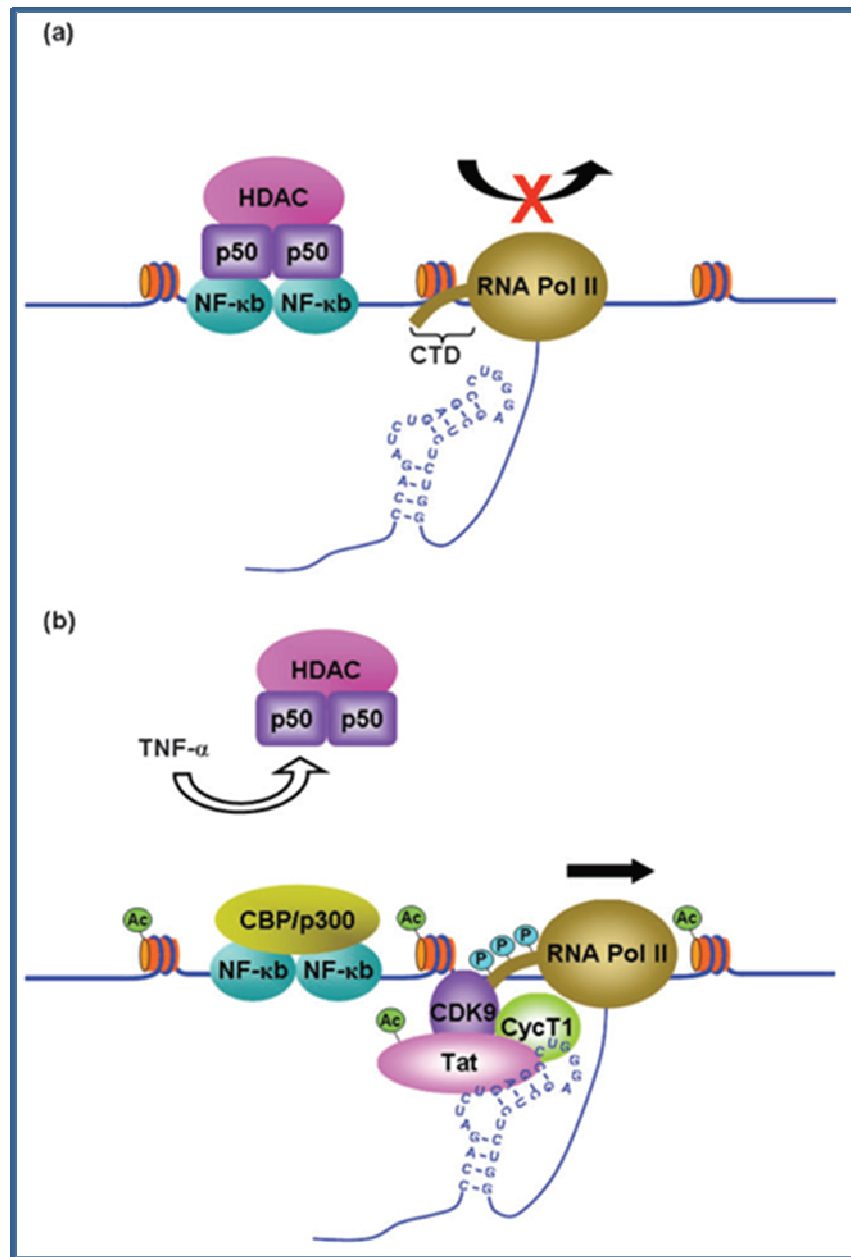


Figure 21 : Rôle de Tat dans la transcription du génome viral. (a) En l'absence de Tat, les complexes NF-κB, p50 et HDAC1 se fixent sur le LTR viral et empêchent la synthèse d'ARNm de taille complète. (b) La protéine Tat permet de lever la répression par le recrutement des complexes CBP/p300 et CycT1-CDK9, responsables de la phosphorylation de l'ARN Pol II, favorisant ainsi une synthèse efficace et complète de transcrits viraux (D'après [204]).

3-3) La protéine Tat extracellulaire

La forme extracellulaire de Tat, sécrétée par les cellules infectées [301], est capable de fixer et pénétrer les cellules cibles [302, 303]. Outre son rôle dans la transcription du génome viral, Tat possède de nombreuses activités extracellulaires [213]. La protéine Tat est présente dans le sérum des patients VIH+ à une concentration de l'ordre du nanomolaire [304, 305]. Tat peut alors agir sur des cellules non infectées en interagissant avec des récepteurs cellulaires et/ou pénétrant dans ces cellules. Aujourd'hui, un faisceau convergent des données suggère un rôle de Tat dans la physiopathologie de l'infection à VIH-1, notamment en agissant sur les cellules du système immunitaire et le système nerveux central (SNC) [213, 306].

3-3-1) Reconnaissance de la molécule Tat extracellulaire

En plus de son rôle dans la réplication virale, La forme sécrétée de Tat agirait sur les cellules non infectées en interagissant avec des récepteurs membranaires. Différents travaux ont rapporté que la molécule CD26, impliquée dans la prolifération des lymphocytes T en réponse à un antigène de rappel, se lie à Tat [307] via son domaine N-terminal. En interférant avec l'activité de CD26, la protéine Tat pourrait être impliquée dans l'anergie des lymphocytes T et ainsi exercer une activité immunosuppressive. Tat est capable de se lier aux récepteurs aux chimiokines CCR2, CCR3 et CXCR4 des monocytes/macrophages, via son domaine riche en cystéine [305, 308]. La protéine Tat attirerait et activerait ainsi des cibles du VIH-1 aux lieux de l'infection [309]. Tat inhiberait la phagocytose des corps apoptotiques par les DC, en interagissant, via son domaine RGD, avec l'intégrine $\alpha\beta3$ [310]. Ce mécanisme participerait fortement à l'altération des fonctions des DC, telle que la présentation antigénique.

Tat pourrait inhiber l'activité cytotoxique des DC et cellules NK, en se fixant sur les canaux calciques de type L [311]. La molécule Tat posséderait également une activité angiogénique associée à son interaction avec les récepteurs au VEGF (Flk1/KDR) et au bFGF [312].

Tat pourrait également se lier au récepteur aux lipoprotéines au niveau neuronal [313], activant ainsi des gènes neuronaux et dérégulant le métabolisme des lipides dans ces cellules. Hormis les récepteurs spécifiques, Tat serait également un ligand de lipides membranaires

[314] et des héparanes sulfates [315]. Les lipides membranaires et les héparanes sulfates seraient également impliqués dans le processus d'internalisation de Tat dans la cellule [316].

3-3-2) Internalisation de Tat extracellulaire

C'est au cours d'études sur les fonctions des protéines codées par le génome du VIH-1 que la protéine Tat fut, pour la première fois, identifiée comme ayant une capacité d'internalisation dans les cellules [317, 318].

3-3-2-1) Internalisation médiée par un récepteur

Les mécanismes d'internalisation de Tat, ainsi que d'autres peptides riches en arginine, étaient considérés comme indépendants des mécanismes d'endocytose [276, 319]. Cependant, plusieurs études ont montré que son internalisation étant fortement réduite à 4°C, Tat pénètre peu dans les cellules ; suggérant l'implication d'un mécanisme actif d'internalisation [285, 320]. Différents mécanismes d'endocytose ont été décrits, tels que l'absorption via la clathrine [321], les cavéoles [302] ainsi que la macropinocytose [322-325]. Bien que l'internalisation de Tat via les cavéoles ait été décrite dans les cellules HeLa [326], ce mécanisme n'aurait pas lieu dans les lymphocytes T qui n'expriment pas la cavéoline [327, 328]. En 2004, les travaux de Vendeville et collègues apportaient déjà un éclairage supplémentaire sur l'implication des mécanismes d'endocytose au cours de l'internalisation de Tat par les lymphocytes T. Ce mécanisme impliquerait les vésicules de clathrine de façon dépendante d'Eps15, de l'intersectine et de la dynamine. La protéine Tat exploiterait le gradient de pH entre les endosomes et le cytoplasme pour échapper à la dégradation et être libérée dans le cytoplasme. Cette translocation de Tat est favorisée par Hsp90.

3-3-2-2) Internalisation par translocation membranaire

La capacité de Tat à entrer dans les cellules dépendrait de l'intégrité de son domaine basique, contenant une séquence de 9 acides aminés riche en arginine. Cette région correspondrait également au signal de localisation nucléaire et au domaine de fixation à l'élément TAR de l'ARN viral [260, 329]. Cette séquence nommée domaine de transduction protéique (DTP), conférerait à la protéine Tat la capacité de pénétrer à l'intérieur des cellules sans intervention d'un récepteur spécifique [330]. Ce domaine peptidique fusionné à des macromolécules permettrait leur entrée dans le cytoplasme cellulaire par simple translocation membranaire [320]. A titre d'exemple, Fawell et collègues ont montré que les protéines de

fusion, formées du peptide de Tat contenant le DTP et la β -galactosidase (β -gal), la peroxydase (HRP) ou la RNase A, sont internalisées par translocation membranaire [331]. La β -gal fusionnée au peptide 37-72 de Tat est détectée dans le foie, le cœur, la rate et dans une moindre mesure les poumons et les muscles [379].

3-3-3) Propriétés immunomodulatrices de Tat

Outre son rôle majeur dans la transactivation du génome viral, Tat serait impliquée dans la modulation des niveaux d'expression de nombreux gènes [102, 297]. La dérégulation du réseau de cytokines observée au cours de l'infection à VIH est en grande partie due à l'effet de la protéine Tat [332-338]. En effet, la protéine Tat extracellulaire qui entre dans les cellules non infectées régulerait l'expression des gènes cibles [339]. A titre d'exemple, Tat régulerait positivement les niveaux d'expression de nombreuses cytokines, du co-récepteur CCR5 du VIH-1 et du récepteur à l'interleukine-2 (IL-2) (CD25) dans les cellules infectées par le VIH-1 [102, 303, 340]. Tat extracellulaire augmenterait la transcription de l'IL-6 et de l'IL-2 et induirait la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α par les monocytes/macrophages [213, 341]. En 1997, Ambrosino et collègues ont identifié une courte séquence, en 5' de l'ARNm d'IL-6 qui contient une séquence UCU capable de lier Tat ; cette interaction est indispensable pour une transcription complète de l'ARNm de l'IL-6. En revanche, Tat régulerait négativement plusieurs gènes, tels que le gène codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) [342].

La protéine Tat extracellulaire induirait l'apoptose ainsi qu'un effet d'immunosuppression [343-346]. Un des mécanismes par lesquels Tat régule l'expression des cytokines serait l'activation de NF- κ B via la protéine kinase R (PKR) [296]. Toutefois, une étude récente montre que Tat issue du sous type C du VIH-1 serait meilleur inducteur de la synthèse de cytokines anti-inflammatoires, telles qu'IL-4 et IL-10, par les monocytes humains, alors que Tat du sous type B, à l'inverse, serait un inducteur préférentiel de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-6 et TNF- α [347].

Tat extracellulaire posséderait de nombreuses autres fonctions contribuant également à l'infectivité et à la pathogenèse liées à l'infection par le VIH-1 [260]. Tat induirait la maturation des DC immatures (augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation CD40, CD80 et CD86) [348]. Tat bloquerait la production d'IL-12, responsable de la stimulation des cellules NK et de l'induction de la différenciation des lymphocytes T

auxiliaires de type Th1 [311, 349]. L'inhibition de la production d'IL-12 pourrait ainsi expliquer la diminution de l'activité des cellules NK et le déséquilibre Th1-Th2 observés chez les patients séropositifs. Tat inhiberait la phagocytose des corps apoptotiques par les cellules accessoires [310].

3-3-4) Effets de Tat sur le système nerveux central

Le VIH est neurotrope et envahit directement le tissu cérébral peu après l'infection. En conséquence, le VIH cause des difficultés cognitives telles que la démence associée au VIH (HAD). La HAD se développe chez environ 20% des individus à des stades avancés de l'infection dans les pays industrialisés [350]. Les ROS (ROS pour Reactive oxygen species) sont naturellement issues du transport d'électrons dans la mitochondrie et des réactions enzymatiques redox dans le cytoplasme. Les ROS, à cause du stress oxydatif qu'elles induisent, seraient une cause majeure des maladies neurodégénératives chroniques [351]. Le stress oxydatif est présent dans le cerveau et le liquide cébrospinal des patients HAD [352]. De plus, plusieurs études décrivent Tat comme un potentiel contributeur de la démence associée au VIH-1 [353]. Par ailleurs, Tat peut être transférée du cerveau à la moelle épinière. Ce transfert expliquerait comment la protéine virale peut causer la neurotoxicité et le dysfonctionnement au niveau des sites distants de la réplication virale [354]. Les tissus du cerveau sont sensibles à la toxicité de Tat [354]. En effet, Tat augmenterait le calcium intracellulaire dans les neurones [355] ; conduisant à la génération des ROS, l'activation des caspases et finalement l'induction de l'apoptose des neurones [356]. Tat est capable de franchir la barrière hémato-encéphalique. De plus, des niveaux élevés d'ARNm de Tat ont été retrouvés dans les extraits de cerveau de patients atteints de HAD [357, 358]. Les séquences de Tat chez ces patients sont mutées, présentant des substitutions de glutamate dans le second exon. Ces mutations pourraient réduire la capacité de Tat à pénétrer les cellules, ce qui aurait pour conséquence l'augmentation des concentrations des protéines Tat extracellulaires, éventuellement associée aux effets neurotoxiques sur les cellules.

La protéine Tat régule positivement l'expression de Par-4 (prostate apoptosis response-4) dans les neurones, ce qui aurait pour conséquence l'induction de l'apoptose par stress oxydatif. En effet, l'augmentation d'expression de Par-4 est suivie d'un dysfonctionnement mitochondrial et de la perturbation des canaux et récepteurs de glutamate, régulés par le

calcium. Price et collègues. ont montré que Tat cause le stress oxydatif, de façon dépendante du temps, en diminuant les niveaux du glutathion intracellulaire et en augmentant les niveaux du glutathion oxydé [359]. Tat serait capable d'induire une neurotoxicité en interagissant directement avec le récepteur d'endocytose, le « lipoprotein receptor-related protein » (LRP) impliqué entre autres dans la signalisation calcique neuronale [360]. Tat pourrait également agir indirectement en induisant la production des métalloprotéinases de la matrice MMP-2 [361, 362] qui favorisent l'apoptose neuronale.

Outre les neurones, la protéine Tat serait aussi capable de cibler d'autres cellules du système nerveux central, notamment la microglie, les macrophages [363] et les astrocytes [364]. Tat induirait la production de TNF- α qui est cytotoxique pour les oligodendrocytes. Ainsi, la production de Tat dans les neurones de souris transgéniques s'accompagne d'une démyélinisation, d'une infiltration de lymphocytes, d'une astroglie et d'une microglie. Récemment, il a été montré que la protéine Tat extracellulaire induit l'expression de MMP 9 dans les astrocytes via une voie dépendante de NF- κ B [339].

Tat jouerait donc un rôle important au cours de la neuropathogénèse, à la fois comme médiateur intracellulaire et extracellulaire de la neurotoxicité [365].

3-3-5) Rôle de Tat dans l'activation de virus non apparentés au VIH

En plus de la modulation du génome viral et de l'expression de nombreux gènes cellulaires, Tat serait également impliquée dans l'activation de certains pathogènes tels que des virus non apparentés au VIH [102]. L'activation du papillomavirus humain (HPV) et du virus de l'herpès associé au syndrome de Kaposi (KSHV) par la protéine Tat conduirait à une néoplasie [366] Tat serait aussi impliquée dans la stimulation du virus JC, l'agent étiologique de la leuco encéphalopathie multifocale progressive, responsable d'une démyélinisation chez les individus infectés par le VIH. Bien que l'immunosuppression induite par le VIH-1 soit impliquée dans l'infection du cerveau par le virus JC, une association directe avec l'activité de Tat aurait été établie. En effet, Tat activerait le TGF- β dans les cellules infectées par le VIH-1 et stimulerait la transcription et la réplication d'ADN du virus JC dans les oligodendrocytes. [102]. La protéine Tat pourrait également stimuler la pathogénèse du polyomavirus BK, responsable de néphropathie, détectée chez les transplantés rénaux. [367]. L'infection par le polyomavirus BK est asymptomatique chez la plupart des sujets sains mais

devient un sérieux problème pour les patients à immunité compromise, tels que les patients VIH+ [368].

3-3-6) Rôle de Tat dans le développement des cancers associés au SIDA

Le cancer est généralement lié à l'instabilité des voies de réparation de l'ADN qui maintiennent la stabilité génomique. En effet, un défaut dans les voies de réparation pourrait être inducteur de cancer [369, 370]. Le SIDA est accompagné d'une augmentation significative de l'incidence de tumeurs. Plusieurs raisons telles que l'immunodéficience, les virus oncogènes et la protéine Tat du VIH-1, ont été proposées pour expliquer ce phénomène. De plus, il a également été suggéré que les défauts de réparation d'ADN induits par Tat pourraient être impliqués dans le développement de cancers associés au SIDA [371]. Ainsi, les patients VIH-1/SIDA atteints de cancer présentent de graves réactions tissulaires et développent souvent des effets toxiques cutanés lorsqu'ils sont soumis à la radiothérapie. Des expériences in vitro ont montré que les lignées cellulaires humaines exprimant Tat voient leur capacité à réparer les cassures d'ADN induites par le rayonnement complètement réduite [372].

Par ailleurs, Tat favoriserait l'adhésion, la migration, l'invasion et la croissance des cellules de sarcome de Kaposi, ainsi que l'activation des cellules endothéliales par les cytokines inflammatoires de type Th1. Chez les individus infectés par le VIH-1, le sarcome de Kaposi est plus fréquent et sévère. Cette sévérité serait due à l'action synergique de Tat avec le facteur de croissance basique de fibroblastes (bFGF) en favorisant l'angiogenèse, la perméabilité vasculaire et les œdèmes, qui sont les principaux processus impliqués dans la progression du sarcome de Kaposi [373]. La profusion du sarcome de Kaposi chez les individus VIH-1+ serait également attribuée au rôle de Tat dans la facilitation de la réplication du virus de l'herpès associé au sarcome de Kaposi (KSHV) [366]. De plus, Tat faciliterait l'infection des cellules par le KSHV [366].

3-3-7) Tat comme cible vaccinale et/ou thérapeutique

Plusieurs arguments seraient en faveur de l'utilisation de Tat comme cible vaccinale du fait de son rôle dans le cycle viral et ses éventuelles implications comme facteur de pathogénicité. En effet, Tat est rapidement produite au cours du cycle viral [374, 375] et est essentielle à la transcription virale qui est totalement abolie si la protéine virale est mutée

[376, 377]. De plus, Tat induirait une immunité humorale et cellulaire antivirale cytotoxique [376, 377]. Toutefois, les essais de vaccination avec la protéine Tat, dans le modèle VIS/macaque, semblent donner des résultats controversés [378]. L'utilisation de Tat biologiquement active comme cible vaccinale mettrait en évidence une réponse immunitaire cytotoxique médiée par les lymphocytes T CD8+, plutôt qu'une réponse anti-Tat qui reste absente [379, 380]. Cependant, des études de vaccination menées chez le macaque rhésus avec la protéine Tat, sous forme native, dénaturée, vectorisée ou utilisant des peptides de Tat ont montré soit une protection partielle [381] ou non [382, 383], soit une progression de la maladie [384]. Plusieurs éléments, tels que l'espèce de macaque utilisée, l'immunogénicité et les voies d'administration du vaccin, pourraient expliquer les différences dans les résultats obtenus.

Aujourd'hui, il est clair que l'utilisation de la protéine Tat seule n'est pas suffisante pour un vaccin efficace contre le VIH-1. Des hypothèses convergent vers l'utilisation d'une combinaison de protéines virales de structure et de régulation, comme semblent le montrer les essais utilisant différentes protéines du VIH-1 [375, 385, 386].

La séquence ci-dessous est celle de la protéine Tat 133A du VIH-1, issue d'un isolat primaire de patient hollandais, utilisée pendant mes travaux de thèse :

10	20	30	40	50	60
MEPVDPRLEP WKHPGSQPRT ACTNCYCKKC CFHCQVCFIR KALGISYGRK KRRQRRRAPQ					
70	80	90	100	101	
DSETHQVSPK KQPASQPRGD PTGPKESKKK VERETETHPV N					

OBJECTIFS

Le système immunitaire est schématiquement divisé en deux volets : un volet inné et un volet acquis. Alors que la reconnaissance du non soi par l'immunité adaptative implique des récepteurs spécifiques des antigènes, l'immunité innée, première ligne de défense immunitaire, n'est pas spécifique de micro-organismes. Les cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée sont essentiellement les épithéliums, les polynucléaires neutrophiles (PNN), les polynucléaires éosinophiles, les polynucléaires basophiles, les mastocytes, les cellules « natural killer » (NK), les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques. La reconnaissance des micro-organismes ou de composants microbiens par ces cellules fait intervenir des récepteurs, appelés Pattern Recognition Receptors (PRR). Les PRR ont été sélectionnés au cours de l'évolution pour leur capacité à reconnaître des motifs hautement conservés à travers les genres et essentiels à la survie des micro-organismes. Ces motifs microbiens sont appelés Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP). La composante moléculaire de l'immunité innée est composée des PRR associés aux cellules, impliqués dans les mécanismes d'endocytose et d'activation et des PRR solubles, sécrétés par les cellules, impliqués dans la capture et l'élimination des micro-organismes et de composants microbiens.

La détection virale par les cellules de l'immunité innée implique des PRR solubles et des PRR associés aux cellules. Certaines glycoprotéines du VIH interagissent avec les membres de la famille CLR. En effet, la fixation de la glycoprotéine gp120 à DC-SIGN joue un rôle majeur dans l'entrée du VIH dans les cellules immunitaires et dans sa diffusion au sein de l'organisme d'individus infectés. L'interaction de gp120 avec le récepteur soluble MBL conduit à l'élimination du virus par la voie lectine du complément.

Aujourd'hui, il est clairement établi que la protéine Tat du VIH-1 est indispensable dans la synthèse de virions infectieux et jouerait un rôle dans la pathogenèse. De plus, la forme extracellulaire de Tat serait impliquée dans la régulation de nombreux gènes cellulaires. Cependant, l'interaction de cette protéine majeure du VIH, sécrétée par les cellules infectées, avec les récepteurs de l'immunité innée, en particulier les PRR solubles, reste inexplorée.

Dans un premier temps, j'ai évalué la capacité des protéines du VIH-1 (gp120, Tat, Rev et p24) à interagir avec les PRR solubles et analysé les conséquences des potentielles interactions sur la fonction de chaque protéine au cours de l'infection à VIH-1. Nous avons

ainsi observé que la protéine Tat interagit sélectivement avec les PRR solubles SAP, CRP et PTX3, tous les trois appartenant à la famille des pentraxines. Cependant, seule la pentraxine CRP potentialise l'activité de transactivation de la protéine Tat en la protégeant de la protéolyse au cours de la translocation membranaire et en permettant son accumulation nucléaire. Ce travail a été soumis pour publication dans la revue *Journal of Biological Chemistry*.

Dans un deuxième temps, sur la base de cette première étude et d'un travail récemment publié qui montre que Tat issue du sous type C du VIH-1 serait meilleur inducteur de la synthèse de cytokines anti-inflammatoires, telles que IL-4 et IL-10, par les monocytes humains, alors que Tat du sous type B, à l'inverse, serait un inducteur préférentiel de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6 et TNF- α [347], j'ai initié l'étude de l'impact des complexes formés par la protéine Tat et les pentraxines SAP, CRP et PTX3 sur la différenciation des monocytes en cellules dendritiques, CPA indispensables à l'initiation d'une réponse adaptative efficace. Les travaux préliminaires de cette étude m'ont permis de montrer que la protéine Tat influence la différenciation des monocytes en DC, en empêchant l'acquisition du récepteur membranaire CD1a par les DC et en orientant ces dernières vers un phénotype de type immunosuppresseur.

Par ailleurs, dans le cadre du projet fédératif MAb IMPACT « IMProving ACTivation of Fc γ RIIIa-expressing effector cells ; pharmacogenetic-based optimisation of monoclonal antibody therapy for cancer », j'ai initié l'étude sur l'évaluation de la régulation de l'expression de CD16 par les monocytes, macrophages et DC humains. Les principaux résultats mettent en évidence, non seulement une augmentation du CD16 membranaire sur les monocytes/macrophages et une induction sur les DC, mais également une acquisition par la sous-population de monocytes CD14⁺CD16⁻, activés par les cytokines IL-1 β , IL-6, IL-10 et IL-21. Ces résultats suggèreraient un rôle des cytokines IL-1 β , IL-6, IL-10 et IL-21 dans l'augmentation du nombre de monocytes CD14⁺CD16⁺ au cours de processus inflammatoires et/ou infection. Ce travail a fait l'objet d'un manuscrit qui sera soumis très prochainement pour publication.

MANUSCRIT 1

La protéine de la phase aigüe de l'inflammation CRP potentialise l'activité de transactivation de la protéine Tat du VIH-1

“The acute phase protein CRP potentiates the transactivation activity of the HIV-1 protein Tat”

Ulrick Mavoungou Bigouagou, Pascale Jeannin, Sébastien Jaillon, Simon Blanchard, Philippe Hulin, Bernard Verrier, Jean-Claude Sirard, Alberto Mantovani, Michel Leonetti, Christophe Guillon, Yves Delneste

Manuscrit soumis dans la revue Journal of Biological Chemistry

INTRODUCTION

Les cellules cibles du VIH sont essentiellement les lymphocytes T CD4⁺ mais aussi, à un niveau moindre, les monocytes-macrophages, les cellules dendritiques, les cellules NK, les cellules de Langerhans et les cellules microgliales cérébrales. Les organes lymphoïdes, en particulier les ganglions lymphatiques, constituent les principaux sites de réplication du virus. Le VIH utilise différents récepteurs pour infecter les cellules de l'hôte (ex : CXCR4 et CCR5) [69]. Actuellement, seule une interaction entre des PRRs de la famille des lectines de type C (DC-SIGN et MBL) et des protéines d'enveloppe glycosylées du VIH (gp120/gp41) a été rapportée. De nombreuses études ont souligné le rôle de la liaison de gp120 avec DC-SIGN dans la dissémination virale [387]. Cependant, les mécanismes d'interaction des protéines virales avec d'autres types de PRR, tels que les PRR solubles, ne sont pas décrits.

Le VIH a besoin de la protéine Tat pour assurer la transcription efficace et complète de son génome et la production de virions infectieux [204]. La protéine Tat compte 86 à 101 acides aminés selon les souches. Sa séquence est divisée en domaines, dont les caractéristiques sont communes à toutes les souches du VIH-1 : l'extrémité N-terminale riche

en prolines (résidus 1 à 21), une région riche en cystéines (résidus 22 à 37), un domaine « cœur » de séquence fortement conservée (résidus 38 à 48), une région riche en résidus basiques (résidus 49 à 57), un domaine riche en glutamines (résidus 58 à 76) et la région C-terminale de longueur variable. Cette dernière partie comprend un tripeptide RGD (résidus 78-80), motif caractéristique d'attachement à des récepteurs cellulaires de type intégrine.

La protéine Tat est un puissant trans-activateur de la transcription du VIH qui utilise la machinerie transcriptionnelle de la cellule hôte et favorise l'élongation du transcrit viral [388]. Tat agit principalement de façon endogène dans les cellules infectées mais également de manière exogène. En effet, la protéine Tat, sécrétée par les cellules infectées, se fixe et est internalisée par les cellules environnantes non infectées [389].

En plus de son rôle trans-activateur, Tat contribuerait à altérer la réponse immune de l'hôte en modulant la synthèse de nombreux gènes impliqués dans la réponse immune antivirale et en particulier des cytokines comme l'IL-2, l'IL-6 ou l'IL-8 [337], des chimiokines, les molécules du CMH-I et des protéines de surface qui jouent un rôle de co-récepteur pour le virus [390], l'activation des cellules dendritiques [51, 391] mais également dans la prolifération cellulaire et la modulation des voies apoptotiques [392]. Alors que la molécule Tat extracellulaire augmenterait la sensibilité des cellules non infectées à la mort par apoptose, en particulier des lymphocytes T [388, 393], la forme intracellulaire protégerait les cellules infectées [394]. L'ensemble de ces fonctions conférerait à Tat un rôle crucial dans la pathogénèse du SIDA et dans les anomalies immunitaires observées chez les individus infectés.

Cependant, les mécanismes d'interaction de la forme extracellulaire de Tat avec les cellules de l'hôte restent mal caractérisés. La protéine Tat étant une protéine du non-soi, nous avons émis l'hypothèse que sa forme soluble pourrait interagir avec des PRR solubles.

Le but de cette étude a été d'évaluer les interactions potentielles entre la protéine Tat du VIH-1 et les PRR solubles, en particulier les pentraxines.

PRINCIPAUX RESULTATS

Cette étude nous a permis de montrer une interaction sélective de la protéine Tat du VIH-1 avec les pentraxines SAP, CRP et PTX3.

- L'interaction de Tat avec SAP, CRP et PTX3 est dépendante de la dose. Cependant, aucune interaction de Tat avec d'autres PRR solubles LOX-1-Fc, SR-PSOX ou MBL n'a été observée. La reconnaissance de Tat nécessite que les pentraxines soient sous

une forme homopentamérique. En effet, les pentraxines réduites lient très faiblement la molécule Tat, en comparaison aux protéines natives. Contrairement à la pentraxine longue PTX3, l'interaction des pentraxines courtes SAP et CRP est dépendante du calcium.

- L'utilisation de peptides chevauchants de 15 acides aminés couvrant la séquence de Tat a permis de montrer que les domaines riche en cystéine et basique de Tat contiennent les sites impliqués dans son interaction avec les pentraxines. L'utilisation de l'héparine, liant Tat sur son domaine basique, a mis en évidence l'inhibition de l'interaction Tat-PTX, confortant le résultat obtenu avec les peptides.
- La phosphocholine, un ligand commun aux trois pentraxines, inhibe l'interaction de Tat avec les pentraxines, mettant ainsi en évidence l'interaction de Tat avec les pentraxines par leur domaine C-terminal, également impliqué dans la reconnaissance de leurs autres ligands
- L'évaluation de l'impact des pentraxines sur la transcription du VIH induite par Tat nous a permis de montrer que seule la protéine de la phase aiguë de l'inflammation CRP potentialise l'activité de transactivation de Tat.
- Afin de comprendre pourquoi seule CRP avait un effet sur l'activité de transactivation de Tat, nous avons évalué l'influence des pentraxines sur la fixation et/ou l'entrée de la molécule Tat dans les cellules épithéliales, myéloïdes et lymphoïdes humaines. Nous avons observé que la fixation et/ou l'entrée de Tat n'est pas altérée par les pentraxines, même lorsque les cellules sont au préalable traitées avec un excès de pentraxine ou d'immunoglobulines humaines.
- Ensuite, nous avons observé que les trois pentraxines protègent Tat de la protéolyse de la même façon. Cette protection concernerait la partie N-ter de la protéine virale.
- Enfin, grâce à l'analyse de la localisation intracellulaire de Tat seule ou complexée aux pentraxines, nous avons pu observer par microscopie confocale que CRP permet une accumulation nucléaire de la molécule Tat.

**The acute phase protein CRP potentiates the transactivation activity
of the HIV-1 protein Tat**

Ulrick Mavoungou Bigouagou^{1,2}, Pascale Jeannin^{1,2,3}, Sébastien Jaillon^{1,2,*}, Simon Blanchard^{1,2,3}, Philippe Hulin⁴, Bernard Verrier⁵, Jean-Claude Sirard⁶, Alberto Mantovani⁷, Michel Leonetti⁸, Christophe Guillon⁵, Yves Delneste^{1,2,3}

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes Angers, Angers, France

² Université d'Angers, UMR_S 892, Angers, France

³ CHU d'Angers, Laboratoire d'Immunologie et d'Allergologie, Angers, France

⁴ Plateforme de microscopie confocale (PiCell), IFR26, Nantes, France

⁵ Centre National de la Recherche Scientifique, Unité 5086, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Lyon, France; Université de Lyon, Lyon, France

⁶ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 801; Institut Pasteur de Lille; Université de Lille, Lille, France

⁷ Istituto Clinico Humanitas IRCCS, Rozzano, and Dipartimento di Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy

⁸ CEA, DSV, iBiTec-S, SPI, LIAS, Gif-Sur-Yvette, France

* Present adress : Istituto Clinico Humanitas IRCCS, Rozzano, and Dipartimento di Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy

Corresponding author: Yves Delneste, Inserm Unit 892, University Hospital of Angers, Bâtiment Montéclair, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France

e-mail address: yves.delneste@univ-angers.fr

Tel: +33 (0) 244 688 300

Fax: +33 (0) 244 688 203

Abbreviations. CRP, C-reactive protein; DC, dendritic cells; SAP, serum amyloid P; PTX, pentraxin; PTX3, pentraxin 3

Abstract

Soluble Pattern Recognition Receptors (PRR) recognize microbes and are involved in their elimination and in the activation of immune cells. Virus and viral motifs are recognized by soluble PRR and regulate their infectivity and the induction of protective responses against HIV. The aim of this study was to analyze the interaction of extracellular Tat with soluble PRR. Results showed that Tat interacts selectively with members of the pentraxin family, SAP, CRP and PTX3 via the cystein-rich and basic domains. Interestingly, CRP, but not SAP and PTX3, increased the transactivation activity of Tat. Pentraxins did not modulate the binding of Tat to different cell types and were equivalent to protect Tat from proteolysis. In contrast, confocal microscopy revealed that CRP, but not SAP and PTX3, favors the nuclear accumulation of Tat. These results show that the short pentraxin CRP, whose production is induced during microbial infections, increases the Tat-induced HIV-1 transcription. The association of Tat with CRP could have pathophysiological consequences by increasing virus replication and load and evidence a mechanism allowing Tat to exploit the humoral innate immunity to promote virus propagation.

Introduction

The transcription of the HIV-1 genes is dependent on the viral protein Tat. Tat is a 86-101 residues protein [1-3] encoded by two exons, which N-ter region (amino acids 1 to 72) contains the transactivation domain [4-6]. After synthesis, Tat is transported into the nucleus [7] where it interacts with host factors and the TAR region of viral RNA to induce transcript elongation and viral gene expression [8,9].

Tat can be secreted from infected cells [10,11] and numerous biological activities have been dedicated to extracellular Tat. Extracellular Tat may promote virus replication and disease by increasing the transcriptional activity of HIV-LTR [12] and may transactivate genes encoding cytokines and cytokine receptors [13-15] in a NF- κ B-dependent manner [16]. Exogenous Tat exhibits angiogenic activity [17-19] and stimulates endothelial cell proliferation [20-22], chemo-invasion [21] and activation of endothelial cells [23]. Exogenous Tat has been also reported to interfere with the apoptosis of non infected cells [24-26], even though this property remains debated [27]. Dysfunction of the central nervous system, neurotoxicity and vascular abnormalities in the course of HIV infection have been associated to Tat [28-30]. Whether the activity of exogenous Tat is related to receptor-mediated signaling or to internalization and transport to the nucleus remains unclear [31-33]. Interestingly, exogenous Tat is present in the serum of HIV-infected subjects at concentrations similar to the one inducing in vitro biological activities [34-36].

Innate immune cells are sensors that discriminate self from non self via innate immunity receptors, also called pattern recognition receptors (PRR) [37]. PRR recognize highly conserved motifs expressed by large families of microbes and called pathogen-associated molecular patterns or PAMPs [38]. PRR can be classified into three families, based on their functions. Endocytic receptors, expressed at the cell surface, mediate recognition and internalization of microbes and/or microbial moieties. Signaling receptors, expressed at the cell surface or intracellularly, are involved in cell activation in response to microbial moieties. Soluble PRR, also called opsonins, bind microbes and facilitate their elimination by phagocytes.

Accumulating evidences show that, among the soluble PRR, members of the pentraxin family are important partners in the innate immune response and in the initiation of adaptive immune

responses. They are mainly involved in the early phases of the immune response. Pentraxins (PTX) are highly conserved proteins characterized by a cyclic homopentameric structure. PTX are classified in two subfamilies, based on the length of the N-terminal domain. In addition to the C-terminal pentraxin domain which contains the pentraxin signature, long pentraxins contain an extra N-terminal domain unrelated to other known proteins. The short pentraxins serum amyloid P (SAP) and C-reactive protein (CRP), also known as acute phase proteins, are produced in the liver in response to IL-6 [39]. PTX3, the prototypic long pentraxin [39], is produced by numerous cell types, except hepatocytes, in response to proinflammatory cytokines and PAMPs. More recently, a new member of the long pentraxin subfamily, PTX4, has been described [40]. Pentraxins bind numerous microbes and microbial moieties and favour their elimination by phagocytes. Pentraxins also actively participate to the inflammatory [41] and adaptative immune responses [42].

The interaction of viruses with PRR may have opposite consequences, i.e. a protective response or an escape from the immune response [43,44]. Pentraxins bind viruses and viral proteins. SAP binds influenza A virus and inhibits the virus-induced erythrocyte agglutination [45]. SAP also inhibits the production of haemagglutinin (HA) and the cytopathogenic effect of influenza A virus on MDCK cells [45,46]. PTX3 binds human cytomegalovirus and inhibits virus-cell fusion and internalization [47]. More recently, PTX3 has been reported to inhibit hemagglutination and viral neuraminidase and to neutralize virus infectivity [48]. Even though Tat plays a pivotal role in the replication and in the pathogenesis of HIV-1, the interaction of its soluble form with soluble PRR, and especially pentraxins, remains undetermined. This study aimed to determine whether Tat may interact with pentraxins and the consequences on the transactivation activity of Tat.

Results

Tat binds to pentraxins. The potential interaction of the HIV-1 proteins Tat, p24, Rev and gp120 with some soluble PRRs was evaluated by ELISA. Results showed that, among the HIV-1 proteins tested, only immobilized Tat selectively bound the pentraxins SAP, CRP and PTX3 (Fig. 1A). No binding of pentraxins was observed on p24, Rev and gp120, whatever the concentration used (Fig. 1A and data not shown). In contrast, Tat did not bind the other soluble PRR tested, MBL, SR-PSOX and LOX-1-Fc (Fig. 1B). The binding of PTX to Tat was dose-dependent, detectable at 0.4 nM (except SAP at 4 nM) and maximal at the highest concentration used (400 nM) (Fig 1C). Pentraxins also bind Tat in solution, as evidenced by diffraction light scattering (Fig. 1D and data not shown). In contrast, no binding of pentraxins to flagellin, used as a control, was observed (Fig. 1A). Pentraxins are homopentameric proteins which binding capacity is significantly diminished upon reduction. Results showed a marked decrease in the binding of reduced pentraxins to immobilized Tat, compared to non reduced proteins (Fig. 1E). Collectively, these results showed a specific interaction of Tat with the functional pentameric forms of the pentraxins SAP, CRP and PTX3.

Identification of the Tat/pentraxin binding domain. Eighteen 15-mer overlapping peptides covering the whole amino acid sequence of Tat were used to determine the domains of Tat involved in its interaction with pentraxins. Results showed that SAP, CRP and PTX3 bind peptide corresponding to amino acids 25-40 (cystein-rich domain) and three contiguous peptides corresponding to amino acids 35-60, covering the basic and glutamine-rich domains. The short pentraxins SAP and CRP, but not PTX3, also bind the peptide 35-50, corresponding to a linking sequence between the cystein-rich and basic domains (Fig. 2A). Heparin, that binds the basic domain of Tat [49,50], inhibited, in a dose-dependent manner, the interaction of Tat with pentraxins, confirming the involvement of this domain in the interaction with pentraxins (Fig. 2B). The interaction of Tat with pentraxins was also inhibited, in a dose-dependent manner, by phosphocholin (Fig. 2C), suggesting that the binding site of Tat is localized within or close to the binding site of pentraxins to bacterial moieties [51]. These results showed that PTX interact with the cystein-rich and basic domains of Tat.

CRP, but not SAP and PTX3, increases Tat-induced HIV-1 transcription. Extracellular Tat is a potent inducer of HIV-1 transcription. We thus evaluated whether the binding of Tat to pentraxins may modulate its transcription activity. As expected [52], extracellular Tat induced HIV-1 transcription (Fig. 3). Surprisingly, CRP, but not SAP and PTX3, increased, in a dose dependent manner, the transactivation of HIV-1 induced by extracellular Tat (Fig. 3). This effect was significant using 8 nM CRP and maximal at the highest amount tested (400 nM) (Fig. 3). These results demonstrate that, even though Tat binds pentraxins in a similar manner, only CRP potentiates its transactivation activity.

Pentraxins do not modulate the binding of Tat to human cells. Tat binds, in a similar manner, the three pentraxins but only CRP potentiates its transcriptional activity. We thus evaluated whether this mechanism may be related to differences in the binding of Tat to cells when complexed to pentraxins. The binding of biot-Tat, complexed or not to pentraxins, to monocytes, HeLa cells and Jurkat cells was evaluated by FACS. As previously reported, biot-Tat binds in a similar manner the three cell types (Fig 4A). The binding of biot-Tat complexed to pentraxins was equivalent to the one observed with biot-Tat alone, whatever the concentrations of pentraxins used (Fig. 4B and data not shown).

Previous studies have reported that pentraxins bind Fc γ R [53,54]. We thus evaluated whether pentraxins may favour the entry of Tat via Fc γ R. To respond to this question, we used myeloid cells as they express the three types of Fc γ R [55]. Human monocytes, macrophages and DC were incubated with biot-Tat, alone or complexed to pentraxins, in the presence of increasing concentrations of pentraxins or human immunoglobulins. Whatever the concentrations used, exogenous pentraxins did not modulate the binding of Tat, alone or complexed to SAP, CRP or PTX3, to monocytes (Fig. 4C), macrophages and DC (data not shown). Moreover, human immunoglobulins did not modulate the binding of biot-Tat and biot-Tat/pentraxin complexes to human myeloid cells (Fig. 4D and annexe 5), whatever the concentration used (1-100 μ g/ml). These results demonstrate that the binding and/or entry of Tat into human cells is not affected by PTXs and does not involve PTX-binding structures.

CRP protects Tat from in vitro proteolysis and favours its nuclear accumulation. We next hypothesized that the potentiating activity of CRP could be related to a protection against proteolysis. In the absence of pentraxins, a 30 min incubation with thermolysin induced the

degradation of Tat, as evidenced by Western Blotting (Fig. 5A). Interestingly, the three pentraxins protected Tat from degradation by thermolysin (Fig. 5A). Two types of profiles were obtained, depending on the monoclonal antibodies used. The N-ter specific mAb 11F8C5 evidenced high molecular weight products (Fig 5A). In contrast, no degradation product was detectable using the C-ter specific mAb 14C12B5, except in the presence of SAP (Fig 5A). These results suggest that the pentraxins mainly protect the N-ter domain of Tat from proteolysis.

Finally, we evaluated whether CRP may potentiate the transactivation activity of Tat by favouring its accumulation in the nucleus. Confocal microscopy showed that Tat is efficiently internalized, as previously reported [56]. The preincubation with pentraxins did not significantly modulate the intracellular accumulation of Tat after 1 h of incubation. In contrast, the levels of Tat in the cytoplasm and nucleus were increased after 3 h when associated with CRP, compared to SAP or PTX3 (Fig. 5B).

Collectively, these results suggest that the binding of Tat to CRP may increase the half life of Tat and its accumulation in the nucleus.

Discussion

Tat interacts with immune cells and exhibits immunomodulatory properties. However, the role of PRR in the biological activities of Tat remains undetermined. We report here that extracellular Tat interacts selectively with members of the PTX family. Interestingly, the interaction of Tat with CRP, but not with SAP and PTX3, potentiates the transactivation activity of Tat. These results highlight a mechanism allowing Tat to divert the immune system for virus propagation.

Previous studies have reported that some HIV moieties interact with PRR, and especially members of the CLR family. The binding of gp120 to DC-SIGN plays a major role in the entry of HIV in immune cells and in the dissemination of the virus in the body of infected individuals. The glycoprotein gp120 also interacts with MBL, leading to the elimination of the virus by the lectin complement pathway [57]. In this study, we evaluated the ability of some HIV-1 proteins to interact with soluble PRR. Results showed that, among the viral proteins tested, only Tat binds the pentraxins SAP, CRP and PTX3.

Pentraxins are soluble PRR produced during the acute phase of inflammation, in response to pro-inflammatory mediators and microbes/microbial moieties. Pentraxins favour the elimination of microbes (via the activation of the complement or via their internalization by phagocytes) and may modulate the adaptive immune response against selected pathogens [58]. Previous studies have reported that PTXs may interact with viruses or viral components. SAP binds the mannose-rich glycans on the influenza virus hemagglutinin (HA) and blocks the binding of HA to its cell surface receptor [45,46]. PTX3 inhibits hemagglutination and viral neuraminidase and neutralizes virus infectivity [48]. Moreover, PTX3^{-/-} mice are more susceptible than wild type mice to an infection with influenza. PTX3 also binds human cytomegalovirus and inhibits virus-cell fusion and internalization [47]

As previously reported for different short PTXs ligands [58], the binding of Tat to SAP and CRP, but not to the long pentraxin PTX3, was calcium-dependent (annexe 2). Interestingly, the binding of Tat to the PTXs was evidenced using PTXs in solution, suggesting that the

interaction of extracellular Tat with PTXs may occur in the extracellular milieu.

Tat exhibits different functional domains. The use of overlapping peptides covering the whole sequence of Tat allowed determining the binding sites to PTXs. Results showed that the cystein-rich and basic domains of Tat contain the PTX-binding domains. Accordingly, the interaction of Tat with PTXs was inhibited by heparin, a ligand of Tat that binds to the basic domain [49]. Supporting these data, we observed that PTXs do not interact with Tat mutated in its basic and cystein-rich domains (annexe 1). The cystein-rich and basic domains are important in the transactivation activity of Tat. Indeed, a single mutation in one of the seven conserved cystein residues localized within the cystein-rich domain induces a loss of Tat transactivating function, resulting from its inability to interact with CDK9 and the cyclin T1[59,60]. We also determined the domain of PTXs involved in their interactions with Tat. The fact that Tat binds in a similar manner to the short and long PTXs is in favour of a binding site within the C-terminal domain of PTXs. This hypothesis was confirmed by the fact that phosphocholin, a bacterial component that binds PTXs [58], inhibited the binding of PTXs to Tat.

Tat enters most cell types, but the mechanism remains undetermined. Tat acts as a cell-penetrating peptide able to translocate across membranes in an energy-and receptor-independent manner. The translocation activity of Tat has been localized within the basic domain, especially in a 9 amino acids arginin-rich sequence [61,62], called protein transduction domain [63]. Tat has been also reported to interact, via its basic domain, with heparan sulfates located at the cell surface [64]; however, the role of heparan sulfates in the internalization of Tat is still controversial [65,66]. We then evaluated whether PTXs may modulate the binding capacity of Tat and/or its cell entry. Results showed that the interaction of Tat with the PTXs did not alter its binding capacity to different cell types (epithelial cells, myeloid and lymphoid cells). Moreover, the binding of Tat was not affected by human immunoglobulins, suggesting that the internalization of the Tat/PTX complexes was not mediated via the FcγR, the recently described PTX-binding elements [53]. Supporting this result, the binding of the Tat/PTX complexes was not affected by a large excess of SAP, CRP or PTX3. Collectively, these results suggest that PTXs do not modify the mechanism of entry of Tat within the cells.

Tat is a crucial component of the HIV life cycle and pathogenesis. We then assessed the ability of PTXs to modulate the transactivation activity of Tat. Surprisingly, we observed that, even though the three PTXs bound in a similar manner Tat, only CRP increased its transactivation activity. Because of the intrinsically disordered nature of Tat [52] that renders it sensitive to proteases [67], we first hypothesized that CRP may protect Tat from proteolysis. However, results showed that the three PTXs were equivalent to prevent and/or delay *in vitro* Tat proteolysis, although degradation products differ between SAP and CRP/PTX3. It is also important to underline that the N-ter domain of Tat, which contains the regions involved in its transactivation activity, is protected by its interaction with the PTXs. However, and unexpectedly, confocal microscopy revealed that CRP, but not SAP and PTX3, favoured the accumulation of Tat in the nucleus. This result suggests that the ability of CRP to potentiate the transactivation activity of Tat may result from its accumulation in the nucleus, rather than an increase of Tat entry into the cells.

In conclusion, this study shows that the short pentraxin CRP potentiates the transactivation activity of Tat. This mechanism appears related to a protection from proteolysis and from an accumulation of Tat within the nucleus. HIV-infected individuals with high circulating CRP levels exhibit a worse response to antiviral therapy [68], a quicker progression towards AIDS [69,70] and a higher HIV-related mortality [71-73]. Based on these data and our results, it is tentative to speculate that the interaction of Tat with CRP, whose production is induced during microbial infections, could have physiopathological consequences by increasing virus replication and load during the course of HIV infection.

Materials and Methods

Reagents. The Tat protein derived from the primary isolate 133A sequence (Genbank accession number DQ459120) [74] was obtained by peptide synthesis (Synprosis, Marseille, France). The 15 mers overlapping peptides of Tat were obtained and used as previously described [75]. Rev and gp120 (HXB2 strain) were obtained through the NIH AIDS reagent program. Recombinant p24 was produced and purified from *Escherichia coli*; endotoxins were removed, as previously described [75]. The anti-Tat antibodies 11F8C5 and 14C12B5 were raised against the N-terminal and C-terminal domains of Tat, respectively [52]. Purified human CRP and SAP were purchased from Chemicon (Temecula, CA) and Sigma-Aldrich (St Louis, MO), respectively. Soluble LOX-1-Fc was produced, as previously described [76]. MBL (US Biological, Swampscott, MA), zymosan (Molecular Probes, Oregon, CA), mannosylated BSA (Sigma-Aldrich), soluble SR-PSOX (R&D Systems, Abingdon, UK) and human Hsp70 (Stressgen, San Diego, CA) were purchased from the respective manufacturers. Flagellin was purified from *Salmonella typhimurium*, as previously described [77]. Heparin, phosphocholine, chloroquine and human immunoglobulins were from Sigma-Aldrich. Anti-SAP, peroxidase-conjugated anti-CRP (both from Sigma-Aldrich), biotin-labeled anti-MBL (US Biological), anti-SR-PSOX (R&D Systems) and anti-LOX-1 (HyCult Biotechnology, Uden, The Netherlands) antibodies were purchased from the indicated manufacturers. The peroxidase-labeled anti-rabbit immunoglobulin and anti-mouse immunoglobulin antibodies were from Biosource (Camarillo, CA).

Cell lines. HeLa and Jurkat cell lines were from ATCC (Manassas, VA) and cultured according to the manufacturer's recommendations. The HL3T1 cell line [78], obtained through the NIH AIDS Reagent Program, was cultured in DMEM containing 4.5 g glucose and supplemented with 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (all from Cambrex, Saint-Beauzire, France) and 10% heat-inactivated FCS (Biowest, Nuaille, France).

PBMC isolation and cell generation. Blood samples from healthy subjects were obtained from the 'Etablissement Français du Sang (EFS) Pays de la Loire' (agreement number ANG-2003-02) in accordance with the Angers University Hospital ethical committee requirements. PBMC were isolated from blood by standard Ficoll-Paque density-gradient (Amersham

Biosciences, Uppsala, Sweden) and resuspended in complete medium consisting in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non essential amino acids, 10 mM Hepes, and antibiotics (all from Cambrex). Monocytes were isolated from PBMC by magnetic sorting using anti-CD14 mAb-coated microbeads (Myltenyi biotec, Bergish Gladbach, Germany). Dendritic cells (DC) were generated in vitro by culturing monocytes for 5 days at 10^6 cells/ml in complete medium containing 20 ng/ml GM-CSF and 20 ng/ml IL-4 (both from R&D Systems). Macrophages were generated in vitro by culturing monocytes for 5 days at 10^6 cells/ml in complete medium containing 2 ng/ml GM-CSF plus 20 ng/ml M-CSF (R&D Systems).

Analysis of the interaction of soluble PRR with HIV-1 proteins by ELISA. The interaction of the HIV-1 proteins Tat, Rev, gp120 and p24 with the pentraxins CRP, SAP and PTX3 or with the soluble PRR LOX-1, SR-PSOX and MBL, used as controls, was analyzed by ELISA. Briefly, viral proteins or eighteen 15-mer overlapping peptides covering the whole amino acid sequence of Tat were immobilized at 10 μ g/well in 96-well ELISA plates (Immulon; Nunc, Roskilde, Denmark) by overnight incubation at 4°C in 50 mM NaHCO₃/Na₂CO₃ buffer, pH 9.6. After a 2 h saturation at 37°C with PBS containing 1% BSA (v:w) (PBS/BSA), wells were washed with PBS containing 0.05% Tween 20 (v:v) (Sigma-Aldrich) (300 μ l/well) before addition of the soluble PRR at the indicated concentrations (100 μ l/well). In some experiments, pentraxins were first incubated for 3 h at 37°C in 0.1 M Tris buffer pH 8.5 containing 30 mM DTT, before addition of iodoacetamide (120 mM final concentration) for a further 1 h incubation at room temperature in darkness. The reaction was stopped by addition of 2 N H₂SO₄. Pentraxins were then dialyzed against PBS before use in ELISA. In others, ELISA was performed in the presence of 250-15000 U/ml heparin or 10-400 μ g/ml phosphocholin. After a 2 h incubation at 37°C, wells were washed with PBS/Tween before detection of the bound PRR. CRP was detected using a peroxidase-conjugated anti-CRP antibody; and PTX3 and SAP were detected using specific mAbs. Bound Abs were revealed by peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin and anti-mouse immunoglobulin antibodies, respectively. LOX-1, SR-PSOX and MBL were detected with specific antibodies. Bound antibodies were revealed using TMB substrate (Sigma-Aldrich). Results were expressed as OD values or as a percentage of inhibition of binding determined as follows: $(A-B/B) \times 100$ where A and B correspond to the OD values without or with competitors, respectively.

DLS measurement of Tat/Pentraxin interaction in solution. Diffraction light scattering (DLS) allows determining the hydrodynamical diameter of proteins. Measures were performed on Tat (60 μ M) or pentraxins alone (400 μ M) in 10 mM PBS, pH 7.4, containing 2 mM CaCl₂. Tat and pentraxin solutions were then mixed and incubated 30 minutes at room temperature before measuring the diameter of the complexes using a NanoS Zetasizer (Malvern Instruments, Malvern, UK).

In vitro transcription assay. The HL3T1 cell line is a derivative of HeLa cells, stably transfected with the CAT reporter gene under the control of the HIV-1 promoter (LTR) [78]. Tat (70 nM) was incubated at room temperature with different amounts of pentraxins (8, 40, 200 and 400 nM) in PBS containing 3.6 mM CaCl₂ for at least 30 minutes. The Tat/pentraxin complexes were then added to HL3T1 cells, cultured for 4 h in the presence of 100 μ M chloroquine. After washing, cells were cultured for a further 48 h. Cells were then collected and resuspended in 100 μ l TEN buffer (40 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl), submitted to one freeze-thaw step before incubation for 20 min at 65°C, as previously described [74,79]. The concentration of CAT in the cell lysates was determined using a CAT ELISA, according to the manufacturer's protocol (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Total protein concentrations were determined using the BCA assay, according to the manufacturer recommendations (Thermo Scientific, Rockford, IL). Results were standardized as the concentration of CAT per ng of total proteins.

Binding of Tat to human cells. The binding of Tat to monocytes, macrophages, DC, HeLa and Jurkat cells was evaluated by FACS. C-ter-biotinylated Tat (biot-Tat; Synprosis), used at 70 nM, was incubated with the cells for 30 min at 4°C. In some experiments, 70 nM biot-Tat was pre-incubated for 1 h at 37°C with SAP, CRP or PTX3 at the indicated concentrations in PBS/BSA containing 2 mM CaCl₂. In others, cells were first incubated with 1-100 μ g/ml human immunoglobulins (Sigma-Aldrich) for 30 min at room temperature, or with pentraxins (5 or 50 μ g/ml) before incubation with biot-Tat or biot-Tat prealably incubated with pentraxins (biot-Tat/PTX). Biot-Tat was detected using Alexa488-labeled streptavidin (Invitrogen, Carlsbad, CA). After washing, the fluorescence was analyzed using a FACScan cytofluorometer (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium).

Analysis of Tat sensitivity to proteolysis. We evaluated whether pentraxins may protect Tat from in vitro proteolysis. Tat (70 nM) was incubated or not with 400 nM pentraxins for 1 h at 37°C before addition of 10 or 60 ng thermolysin in the presence of 2 mM CaCl₂. Samples were collected at 30 and 60 min, boiled for 5 min at 95°C in a migration buffer containing β-mercaptoethanol and EDTA. Samples were then electrophoretically separated on a 20% SDS-PAGE and transferred to a membrane (Immobilon; Millipore, Billerica, MA). After saturation, membranes were incubated for 16 h at 4°C with 5 µg/ml anti-Tat mAbs 11F8C5 or 14C12B5. After washing, membranes were incubated with 1 µg/ml peroxidase-labeled anti-mouse immunoglobulin mAb; bound antibodies were detected using the ECL system (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Analysis of the intracellular localization of Tat by confocal microscopy. Intracellular localization of Tat, alone or associated with pentraxins, was evaluated by confocal microscopy. Tat (70 nM) was first incubated with 400 nM SAP, CRP or PTX3 for 30 min at 37°C in PBS/BSA containing 2 mM CaCl₂. PBMC were incubated for 1 or 3 h at 37°C with Tat alone or Tat-PTX. Cells were then fixed with 4% PFA for 10 minutes at room temperature before permeabilization with PBS containing 0.05% Tween 20 and 0.05% Triton (v/v/v) (both from Sigma-Aldrich) for 10 minutes at room temperature. After washing, cells were incubated with a FITC-labeled anti-Tat polyclonal antibody (ImmunoDiagnostics, Woburn, MA) for 2 h at 4°C. Nuclei were labeled with the TOPRO-3 iodide dye (Invitrogen). Cells were thus fixed using the ProLong Gold polymerizing medium (Invitrogen).

Acknowledgements

This work was supported by institutional grants from Inserm and the University of Angers, by a grant from the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS, <http://www.anrs.fr/>), and by a grant from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR, <http://www.agence-nationale-recherche.fr/>). I state that the funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Ulrick Mavoungou Bigouagou is the recipient of an ANRS doctoral fellowship. The HL3T1 cell line was obtained from B. Felber and G. Pavlakis through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH.

Author contributions: UMB designed and performed the experiments and wrote the paper; SJ, SB and PH performed experiments; BV, JCS and AM provided reagents and intellectual contribution; CG performed experiments and wrote the paper; ML, PJ and YD supervised the study and wrote the paper.

Bibliography

1. Kilareski EM, Shah S, Nonnemacher MR, Wigdahl B (2009) Regulation of HIV-1 transcription in cells of the monocyte-macrophage lineage. *Retrovirology* 6: 118.
2. Jones KA (1993) Tat and the HIV-1 promoter. *Curr Opin Cell Biol* 5: 461-8.
3. Vaishnav YN, Wong-Staal F (1991) The biochemistry of AIDS. *Annu Rev Biochem* 60: 577-630.
4. Cullen BR (1990) The HIV-1 Tat protein: an RNA sequence-specific processivity factor? *Cell* 63: 655-7.
5. Romani B, Engelbrecht S, Glashoff RH Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* 91: 1-12.
6. Arya SK, Guo C, Josephs SF, Wong-Staal F (1985) Trans-activator gene of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). *Science* 229: 69-73.
7. Schwartz S, Felber BK, Benko DM, Fenyó EM, Pavlakis GN (1990) Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 64: 2519-29.
8. Rosen CA, Sodroski JG, Goh WC, Dayton AI, Lippke J, et al. (1986) Post-transcriptional regulation accounts for the trans-activation of the human T-lymphotropic virus type III. *Nature* 319: 555-9.
9. Taylor JP, Cupp C, Diaz A, Chowdhury M, Khalili K, et al. (1992) Activation of expression of genes coding for extracellular matrix proteins in Tat-producing glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 9617-21.
10. Ptak RG, Fu W, Sanders-Beer BE, Dickerson JE, Pinney JW, et al. (2008) Cataloguing the HIV type 1 human protein interaction network. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24: 1497-502.
11. Ensoli B, Buonaguro L, Barillari G, Fiorelli V, Gendelman R, et al. (1993) Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J Virol* 67: 277-87.
12. Mann DA, Frankel AD (1991) Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein. *Embo J* 10: 1733-9.
13. Gupta S, Mitra D (2007) Human immunodeficiency virus-1 Tat protein: immunological facets of a transcriptional activator. *Indian J Biochem Biophys* 44: 269-75.
14. Nabell LM, Raja RH, Sayeski PP, Paterson AJ, Kudlow JE (1994) Human immunodeficiency virus 1 Tat stimulates transcription of the transforming growth factor alpha gene in an epidermal growth factor-dependent manner. *Cell Growth Differ* 5: 87-93.
15. Milani D, Zauli G, Neri LM, Marchisio M, Previati M, et al. (1993) Influence of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on the proliferation and differentiation of PC12 rat pheochromocytoma cells. *J Gen Virol* 74 (Pt 12): 2587-94.
16. Demarchi F, d'Adda di Fagagna F, Falaschi A, Giacca M (1996) Activation of transcription factor NF-kappaB by the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 70: 4427-37.

17. Albini A, Fontanini G, Masiello L, Tacchetti C, Bigini D, et al. (1994) Angiogenic potential in vivo by Kaposi's sarcoma cell-free supernatants and HIV-1 tat product: inhibition of KS-like lesions by tissue inhibitor of metalloproteinase-2. *Aids* 8: 1237-44.
18. Albini A, Barillari G, Benelli R, Gallo RC, Ensoli B (1995) Angiogenic properties of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4838-42.
19. Corallini A, Campioni D, Rossi C, Albini A, Possati L, et al. (1996) Promotion of tumour metastases and induction of angiogenesis by native HIV-1 Tat protein from BK virus/tat transgenic mice. *Aids* 10: 701-10.
20. Ensoli B, Barillari G, Salahuddin SZ, Gallo RC, Wong-Staal F (1990) Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature* 345: 84-6.
21. Albini A, Soldi R, Giunciuglio D, Giraudo E, Benelli R, et al. (1996) The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells. *Nat Med* 2: 1371-5.
22. Barillari G, Buonaguro L, Fiorelli V, Hoffman J, Michaels F, et al. (1992) Effects of cytokines from activated immune cells on vascular cell growth and HIV-1 gene expression. Implications for AIDS-Kaposi's sarcoma pathogenesis. *J Immunol* 149: 3727-34.
23. Hofman FM, Dohadwala MM, Wright AD, Hinton DR, Walker SM (1994) Exogenous tat protein activates central nervous system-derived endothelial cells. *J Neuroimmunol* 54: 19-28.
24. Cossarizza A (2008) Apoptosis and HIV infection: about molecules and genes. *Curr Pharm Des* 14: 237-44.
25. McCloskey TW, Ott M, Tribble E, Khan SA, Teichberg S, et al. (1997) Dual role of HIV Tat in regulation of apoptosis in T cells. *J Immunol* 158: 1014-9.
26. Misumi S, Takamune N, Ohtsubo Y, Waniguchi K, Shoji S (2004) Zn²⁺ binding to cysteine-rich domain of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein is associated with Tat protein-induced apoptosis. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20: 297-304.
27. Roshal M, Zhu Y, Planelles V (2001) Apoptosis in AIDS. *Apoptosis* 6: 103-16.
28. Neri E, Musante V, Pittaluga A (2007) Effects of the HIV-1 viral protein TAT on central neurotransmission: role of group I metabotropic glutamate receptors. *Int Rev Neurobiol* 82: 339-56.
29. Nath A, Conant K, Chen P, Scott C, Major EO (1999) Transient exposure to HIV-1 Tat protein results in cytokine production in macrophages and astrocytes. A hit and run phenomenon. *J Biol Chem* 274: 17098-102.
30. Hudson L, Liu J, Nath A, Jones M, Raghavan R, et al. (2000) Detection of the human immunodeficiency virus regulatory protein tat in CNS tissues. *J Neurovirol* 6: 145-55.
31. Andras IE, Pu H, Deli MA, Nath A, Hennig B, et al. (2003) HIV-1 Tat protein alters tight

- junction protein expression and distribution in cultured brain endothelial cells. *J Neurosci Res* 74: 255-65.
32. Pu H, Tian J, Flora G, Lee YW, Nath A, et al. (2003) HIV-1 Tat protein upregulates inflammatory mediators and induces monocyte invasion into the brain. *Mol Cell Neurosci* 24: 224-37.
 33. Toborek M, Lee YW, Pu H, Malecki A, Flora G, et al. (2003) HIV-Tat protein induces oxidative and inflammatory pathways in brain endothelium. *J Neurochem* 84: 169-79.
 34. Goldstein G (1996) HIV-1 Tat protein as a potential AIDS vaccine. *Nat Med* 2: 960-4.
 35. Westendorp MO, Shatrov VA, Schulze-Osthoff K, Frank R, Kraft M, et al. (1995) HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NF-kappa B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state. *Embo J* 14: 546-54.
 36. Xiao H, Palhan V, Yang Y, Roeder RG (2000) TIP30 has an intrinsic kinase activity required for up-regulation of a subset of apoptotic genes. *Embo J* 19: 956-63.
 37. Gough PJ, Gordon S (2000) The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes Infect* 2: 305-11.
 38. Medzhitov R (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449: 819-26.
 39. Bottazzi B, Garlanda C, Salvatori G, Jeannin P, Manfredi A, et al. (2006) Pentraxins as a key component of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 18: 10-5.
 40. Martinez de la Torre Y, Fabbri M, Jaillon S, Bastone A, Nebuloni M, et al. Evolution of the pentraxin family: the new entry PTX4. *J Immunol* 184: 5055-64.
 41. Deban L, Russo RC, Sironi M, Moalli F, Scanziani M, et al. Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. *Nat Immunol* 11: 328-34.
 42. Jeannin P, Bottazzi B, Sironi M, Doni A, Rusnati M, et al. (2005) Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. *Immunity* 22: 551-60.
 43. Brennan K, Bowie AG Activation of host pattern recognition receptors by viruses. *Curr Opin Microbiol*.
 44. Bowie AG, Unterholzner L (2008) Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 8: 911-22.
 45. Andersen O, Vilsgaard Ravn K, Juul Sorensen I, Jonson G, Holm Nielsen E, et al. (1997) Serum amyloid P component binds to influenza A virus haemagglutinin and inhibits the virus infection in vitro. *Scand J Immunol* 46: 331-7.
 46. Horvath A, Andersen I, Junker K, Lyck Fogh-Schultz B, Holm Nielsen E, et al. (2001) Serum amyloid P component inhibits influenza A virus infections: in vitro and in vivo studies. *Antiviral Res* 52: 43-53.
 47. Bozza S, Bistoni F, Gaziano R, Pitzurra L, Zelante T, et al. (2006) Pentraxin 3 protects from MCMV infection and reactivation through TLR sensing pathways leading to IRF3 activation. *Blood* 108: 3387-96.
 48. Reading PC, Bozza S, Gilbertson B, Tate M, Moretti S, et al. (2008) Antiviral activity of the long chain pentraxin PTX3 against influenza viruses. *J Immunol* 180: 3391-8.

49. Rusnati M, Coltrini D, Oreste P, Zoppetti G, Albini A, et al. (1997) Interaction of HIV-1 Tat protein with heparin. Role of the backbone structure, sulfation, and size. *J Biol Chem* 272: 11313-20.
50. Hakansson S, Caffrey M (2003) Structural and dynamic properties of the HIV-1 tat transduction domain in the free and heparin-bound states. *Biochemistry* 42: 8999-9006.
51. Thompson D, Pepys MB, Wood SP (1999) The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure* 7: 169-77.
52. Foucault M, Mayol K, Receveur-Brechot V, Bussat MC, Klinguer-Hamour C, et al. UV and X-ray structural studies of a 101-residue long Tat protein from a HIV-1 primary isolate and of its mutated, detoxified, vaccine candidate. *Proteins* 78: 1441-56.
53. Lu J, Marnell LL, Marjon KD, Mold C, Du Clos TW, et al. (2008) Structural recognition and functional activation of FcγR by innate pentraxins. *Nature* 456: 989-92.
54. Mold C, Baca R, Du Clos TW (2002) Serum amyloid P component and C-reactive protein opsonize apoptotic cells for phagocytosis through Fcγ receptors. *J Autoimmun* 19: 147-54.
55. Kacs Kovics I (2004) Fc receptors in livestock species. *Vet Immunol Immunopathol* 102: 351-62.
56. Sahaf B, Atkuri K, Heydari K, Malipatlolla M, Rappaport J, et al. (2008) Culturing of human peripheral blood cells reveals unsuspected lymphocyte responses relevant to HIV disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 5111-6.
57. Ji X, Gewurz H, Spear GT (2005) Mannose binding lectin (MBL) and HIV. *Mol Immunol* 42: 145-52.
58. Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu Rev Immunol* 28: 157-83.
59. Rice AP, Carlotti F (1990) Mutational analysis of the conserved cysteine-rich region of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. *J Virol* 64: 1864-8.
60. Koken SE, Greijer AE, Verhoef K, van Wamel J, Bukrinskaya AG, et al. (1994) Intracellular analysis of in vitro modified HIV Tat protein. *J Biol Chem* 269: 8366-75.
61. Jeang KT, Xiao H, Rich EA (1999) Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J Biol Chem* 274: 28837-40.
62. Marcello A, Cinelli RA, Ferrari A, Signorelli A, Tyagi M, et al. (2001) Visualization of in vivo direct interaction between HIV-1 TAT and human cyclin T1 in specific subcellular compartments by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 276: 39220-5.
63. Ezhevsky SA, Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Gius DR, Wei MC, et al. (1997) Hypophosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10699-704.
64. Tyagi M, Rusnati M, Presta M, Giacca M (2001) Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 276: 3254-61.

65. Nakase I, Takeuchi T, Tanaka G, Futaki S (2008) Methodological and cellular aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 598-607.
66. Fittipaldi A, Giacca M (2005) Transcellular protein transduction using the Tat protein of HIV-1. *Adv Drug Deliv Rev* 57: 597-608.
67. Lecoq A, Moine G, Bellanger L, Drevet P, Thai R, et al. (2008) Increasing the humoral immunogenic properties of the HIV-1 Tat protein using a ligand-stabilizing strategy. *Vaccine* 26: 2615-26.
68. Dehovitz JA, Feldman JG, Holman S, Minkoff H (2006) High sensitivity C-reactive protein and response to highly active antiretroviral therapy in women with HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 42: 383-4.
69. Drain PK, Kupka R, Msamanga GI, Urassa W, Mugusi F, et al. (2007) C-reactive protein independently predicts HIV-related outcomes among women and children in a resource-poor setting. *Aids* 21: 2067-75.
70. Lau B, Sharrett AR, Kingsley LA, Post W, Palella FJ, et al. (2006) C-reactive protein is a marker for human immunodeficiency virus disease progression. *Arch Intern Med* 166: 64-70.
71. Feldman JG, Goldwasser P, Holman S, DeHovitz J, Minkoff H (2003) C-reactive protein is an independent predictor of mortality in women with HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 32: 210-4.
72. Chaudhary M, Kashyap B, Gautam H, Saini S, Bhalla P (2008) Role of C-reactive protein in HIV infection: a pilot study. *Viral Immunol* 21: 263-6.
73. Kuller LH, Tracy R, Bellosso W, De Wit S, Drummond F, et al. (2008) Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Med* 5: e203.
74. Guillon C, Stankovic K, Ataman-Onal Y, Biron F, Verrier B (2006) Evidence for CTL-mediated selection of Tat and Rev mutants after the onset of the asymptomatic period during HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22: 1283-92.
75. Guillon C, Mayol K, Terrat C, Compagnon C, Primard C, et al. (2007) Formulation of HIV-1 Tat and p24 antigens by PLA nanoparticles or MF59 impacts the breadth, but not the magnitude, of serum and faecal antibody responses in rabbits. *Vaccine* 25: 7491-501.
76. Delneste Y, Magistrelli G, Gauchat J, Haeuw J, Aubry J, et al. (2002) Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* 17: 353-62.
77. Steiner TS, Nataro JP, Poteet-Smith CE, Smith JA, Guerrant RL (2000) Enteroregulative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 105: 1769-77.
78. Felber BK, Pavlakis GN (1988) A quantitative bioassay for HIV-1 based on trans-activation. *Science* 239: 184-7.
79. Mayol K, Munier S, Beck A, Verrier B, Guillon C (2007) Design and characterization of an HIV-1 Tat mutant: inactivation of viral and cellular functions but not antigenicity. *Vaccine* 25: 6047-60.

Figure legends

Figure 1. Binding of Tat to the pentraxins CRP, SAP and PTX3. **A.** The binding of SAP, CRP and PTX3 to immobilized HIV proteins (Tat, p24, Rev and gp120) was determined by ELISA. Flagellin (Flag) was used as a control protein. Results are expressed in OD values (mean $\pm$ sd, n=10). **B.** The binding of MBL, SR-PSOX and soluble LOX-1-Fc to immobilized HIV proteins (Tat, p24, Rev and gp120) was determined by ELISA. Human Hsp70 and maleylated BSA (mBSA) were used as control of scavenger receptor ligands. Results are expressed in OD values (mean $\pm$ sd, n=10). **C.** Dose-dependent analysis of the binding of SAP, CRP and PTX3 on immobilized Tat or flagellin (Flag). Results are expressed in OD values (mean $\pm$ sd, n=5). **D.** Analysis by diffraction light scattering of the binding of Tat with CRP in solution Results are expressed in diameter values (mean $\pm$ SEM, n=3). **E.** Analysis by ELISA of the binding of native or reduced SAP, CRP and PTX3 on immobilized Tat. Results are expressed in OD values (mean $\pm$ sd, n=5).

Figure 2. Identification of the binding sites of Tat with pentraxins. **A.** Analysis of the binding of SAP, CRP or PTX3 to Tat and 15-mer overlapping peptides of Tat. Results are expressed in OD values (mean $\pm$ sd, n=5). **B.** Evaluation of the capacity of heparin to inhibit the binding of SAP, CRP or PTX3 to immobilized Tat. **C.** Evaluation of the capacity of phosphocholin to inhibit the binding of SAP, CRP or PTX3 to immobilized Tat. **B & C,** results are expressed as a percentage of inhibition (mean $\pm$ sd, n=5).

Figure 3. CRP increases the transactivation activity of Tat. Tat, complexed or not to the pentraxins SAP, CRP and PTX3, was added to the HL3T1 cells. After 48 h, the concentration of CAT in the cell lysates was determined by ELISA. Results are expressed as a CAT/total protein ratio (mean $\pm$ sd, n=5). * $p < 0.05$.

Figure 4. Analysis of the binding of Tat to human cells. **A.** The binding of biotinylated Tat (biot-Tat) was evaluated by FACS on human monocytes, Jurkat cells and Hela cells. Results are representative of one of 6 experiments. **B.** Analysis by FACS of the binding of biot-Tat used alone or complexed to pentraxins (used at the indicated concentrations) to Hela and

Jurkat cells. **C.** Analysis by FACS of the binding to monocytes of biot-Tat used alone or complexed to pentraxins (used at the indicated concentrations), in the absence or presence of 5 µg/ml or 50 µg/ml pentraxins. **D.** Analysis by FACS of the binding to monocytes of biot-Tat, alone or complexed to pentraxins, in the absence or presence of 10 µg/ml human immunoglobulins. **B-C**, results are expressed in MFI values (mean ± sd, n=5).

Figure 5. CRP protects Tat from proteolysis and favours its accumulation in the nucleus. **A.** Tat alone or prealably complexed to pentraxins was incubated for 30 min or 60 min with 60 ng thermolysin. The degradation of Tat was assessed by Western Blotting using anti-Tat mAb specific for the N-terminal (top panel) or C-terminal (bottom panel) domains of Tat. Results are representative of one of five experiments. **B.** Tat, alone or complexed with CRP, SAP or PTX3, was incubated for 1 h or 3 h with human PBMC. After fixation with PFA and permeabilization, Tat was detected using FITC-labeled anti-Tat mAb. Nuclei were stained with TOPRO-3. Results are representative of one out of five experiments.

Figure 1

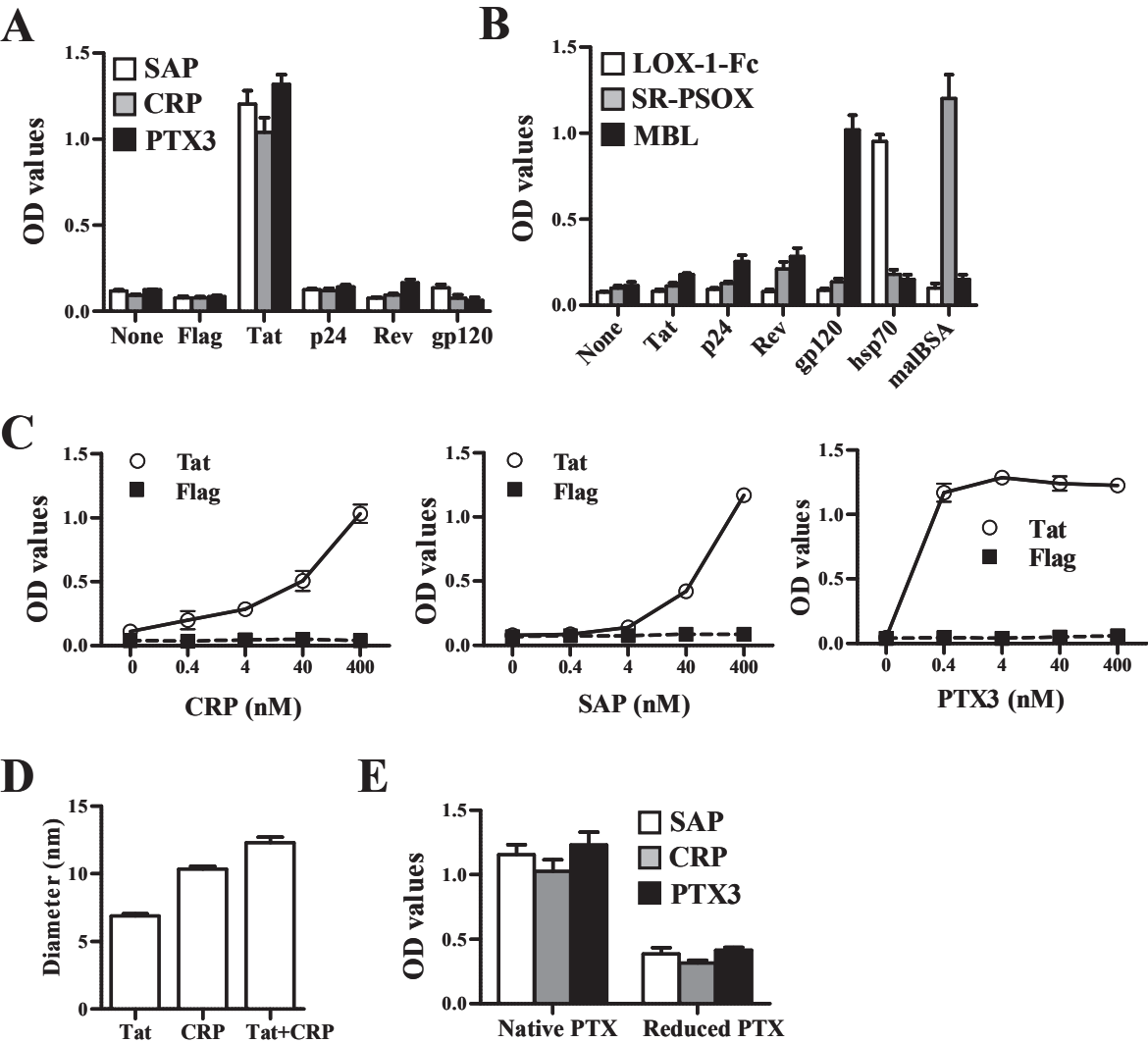


Figure 2

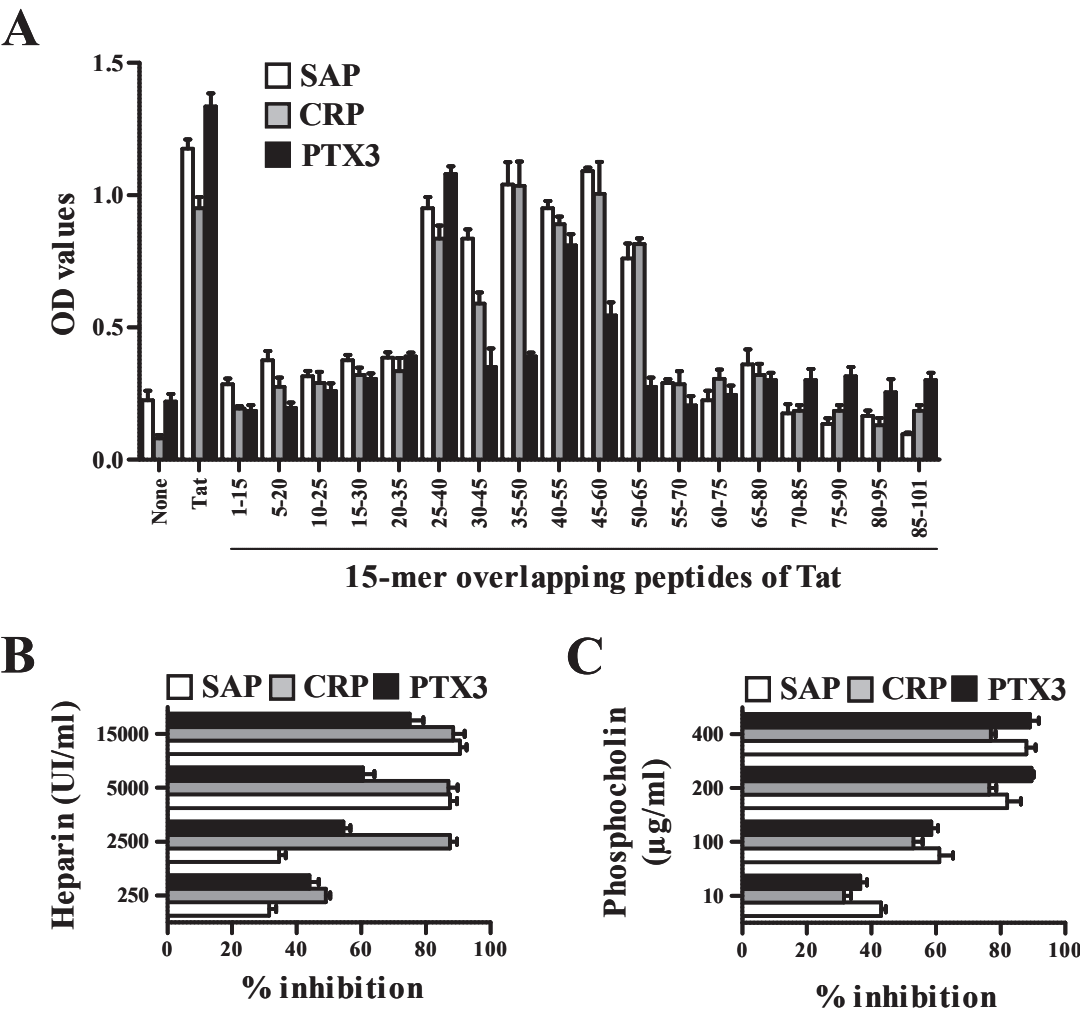


Figure 3

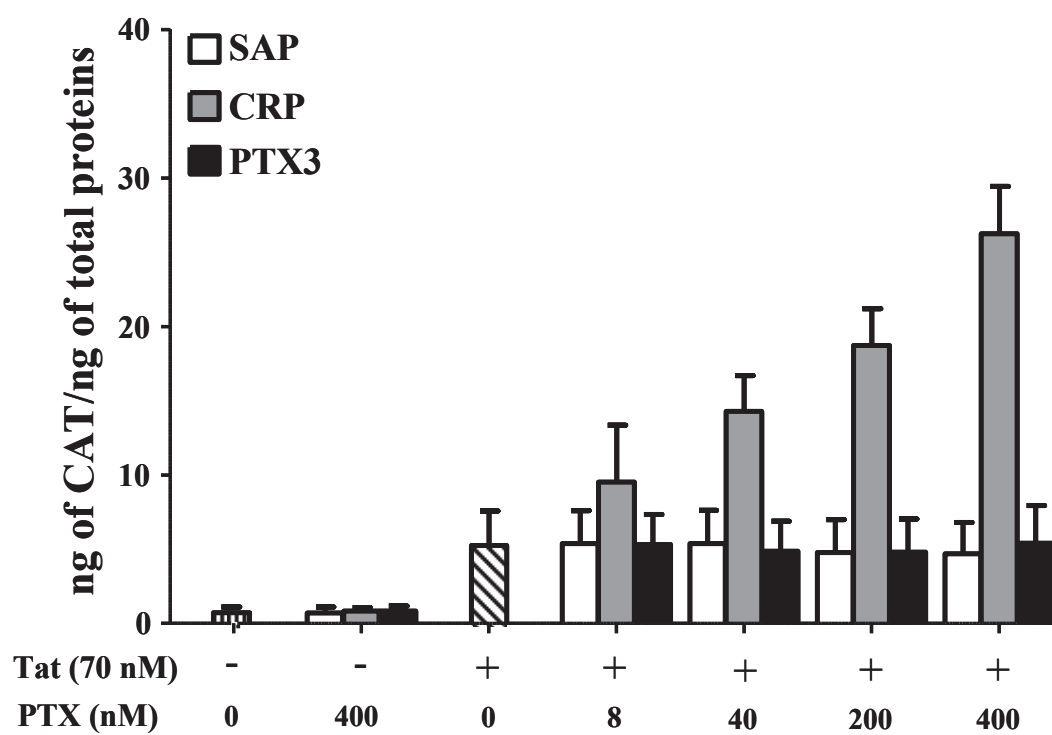


Figure 4

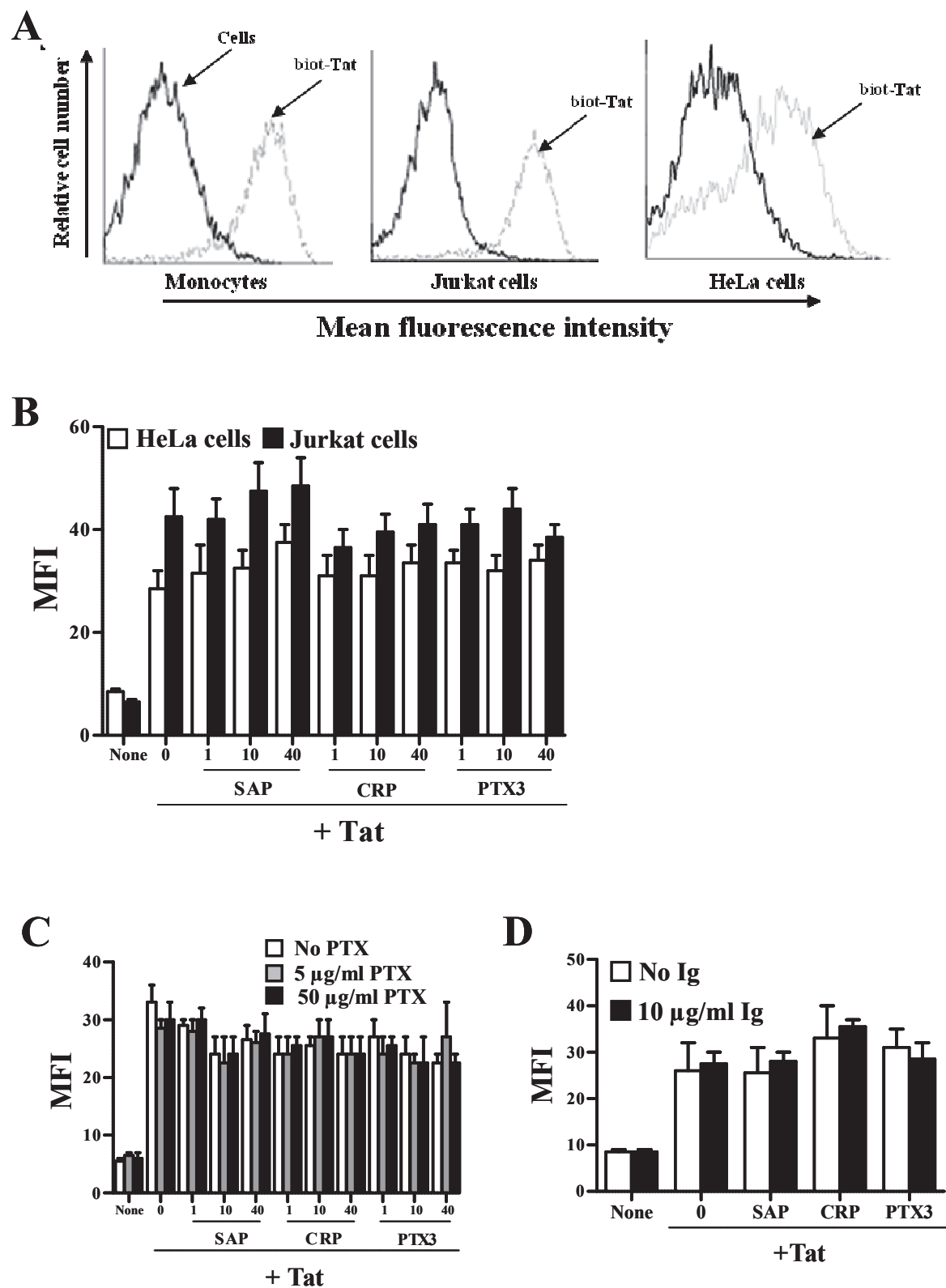
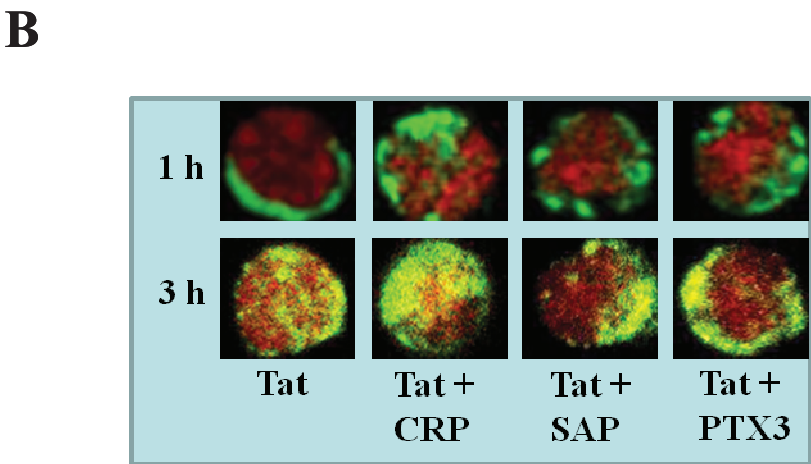
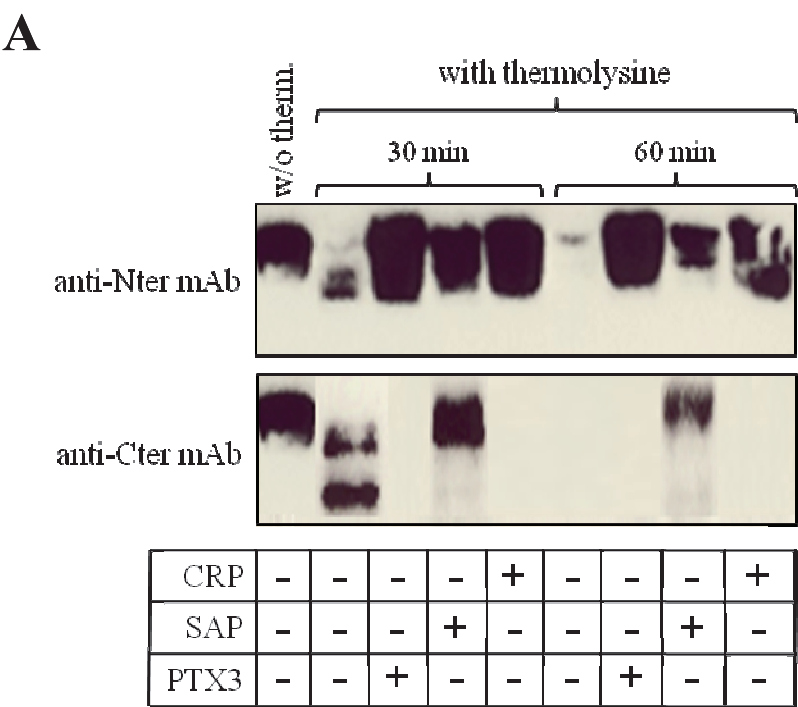


Figure 5



Evaluation de l'impact de Tat et des complexes Tat/pentraxines sur la différenciation des cellules dendritiques

INTRODUCTION

Les DC résident sous forme immature dans les tissus non lymphoïdes et, comme telles, sont hautement adaptées à la capture antigénique via des mécanismes médiés ou non par un récepteur. En effet, la capture antigénique et l'activation par des cytokines pro-inflammatoires induisent des changements phénotypiques et fonctionnels des DC immatures, conduisant ainsi à leur maturation [38]. Les DC immatures expriment des récepteurs aux chimiokines inflammatoires, tels que CCR2, CCR5 et CXCR1, qui permettent leur migration au niveau des sites inflammatoires [46]. Une fois, au niveau de ces sites, les DC matures migrent vers les ganglions drainants pour présenter les antigènes aux lymphocytes T naïfs. Le panel de cytokines qu'elles produisent participe à l'orientation de la réponse immunitaire adaptative.

Les DC sont les CPA les plus efficaces. Elles jouent un rôle clé dans l'induction des réponses immunitaires contre les infections virales [395]. Leur fonction est associée à une forte expression des molécules du CMH, des molécules de costimulation (CD40, CD80, CD86) et à la production de cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-15), impliquées dans l'activation des lymphocytes T. Les DC produisent également des chimiokines telles que MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES. La maturation des DC implique ainsi une réduction de leur capacité de phagocytose et pinocytose [2] et une perte de l'expression de CCR5 au détriment de CCR7 impliqué dans leur migration vers les lymphocytes naïfs.

Au cours de l'inflammation, les monocytes sont capables de se différencier en DC. La migration des monocytes vers les tissus, ainsi que leur différenciation en DC sont probablement déterminées par le milieu inflammatoire et les PRR engagés [8].

De plus, au cours de l'infection à VIH, la phase aigüe (ou de primo-infection) est caractérisée par le développement de symptômes coïncidant avec une virémie plasmatique élevée ayant pour origine une intense réplication du virus dans les organes lymphoïdes [238]. Le rôle crucial de Tat dans la transcription du génome viral et la production de viron infectieux a été largement évoqué dans l'introduction. La présence de Tat dans le sérum d'individus infectés [396, 397] pourrait donc jouer un rôle dans la différenciation des monocytes en DC.

Dans cette étude, le but était d'évaluer le rôle de Tat, seule ou complexée aux pentraxines, dans la différenciation des monocytes en DC, ainsi que l'impact des DC ainsi différenciées sur la nature de la réponse immune adaptative.

RESULTATS PRELIMINAIRES

Cette étude ayant été initiée récemment, nous n'avons qu'un nombre limité de données à présenter.

L'évaluation du rôle de la protéine Tat ou des complexes Tat-PTX dans la différenciation des monocytes en DC a été réalisée en cultivant des monocytes en présence des cytokines IL-4 et Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (ou GM-CSF) en présence ou en l'absence de Tat ou complexes Tat-PTX. Le phénotype des cellules générées a été déterminé en analysant l'expression de marqueurs membranaires et la production de cytokines. Nous avons également analysé la fonction des cellules générées.

- Nous avons observé que la molécule Tat empêche l'acquisition du récepteur membranaire CD1a, spécifique des DC immatures.
- Nous avons également observé que les DC immatures différenciées en présence de Tat expriment de manière plus élevée la molécule de costimulation CD86. Cependant, cette différence n'est pas significative.
- Après activation avec le LPS, nous avons observé une différence non significative dans l'expression de CD40 (expression réduite pour les DC générées en présence de Tat) et de CD86 (augmentation sur les DC différenciées en présence de Tat). En revanche, les niveaux d'expression de CD80, CD83 et CCR7 sont similaires pour les DC générées ou non en présence de Tat
- Nous avons également évalué la production d'IL-10 et IL-12 par les DC générées ou non en présence de Tat et activées avec le LPS. Nous avons observé que les DC obtenues en présence de Tat produisent 3 fois moins d'IL-12 que celles obtenues sans Tat. La production d'IL-10 par les DC obtenues en présence de Tat est réduite.
- En revanche, lorsque les DC sont générées en présence du complexe Tat-CRP, la production d'IL-12 est totalement inhibée, alors que la production d'IL-10 est restaurée ; suggérant ainsi l'orientation des cellules générées vers un phénotype immunosuppresseur.

Comme souligné plus haut, les résultats de cette étude restent préliminaires. Toutefois, ils indiquent clairement des différences significatives entre les DC différenciées ou non en présence de Tat. Ces résultats suggèrent que les DC générées en présence de Tat s'orienteraient vers un phénotype de type tolérogène et/ou immunosuppresseur.

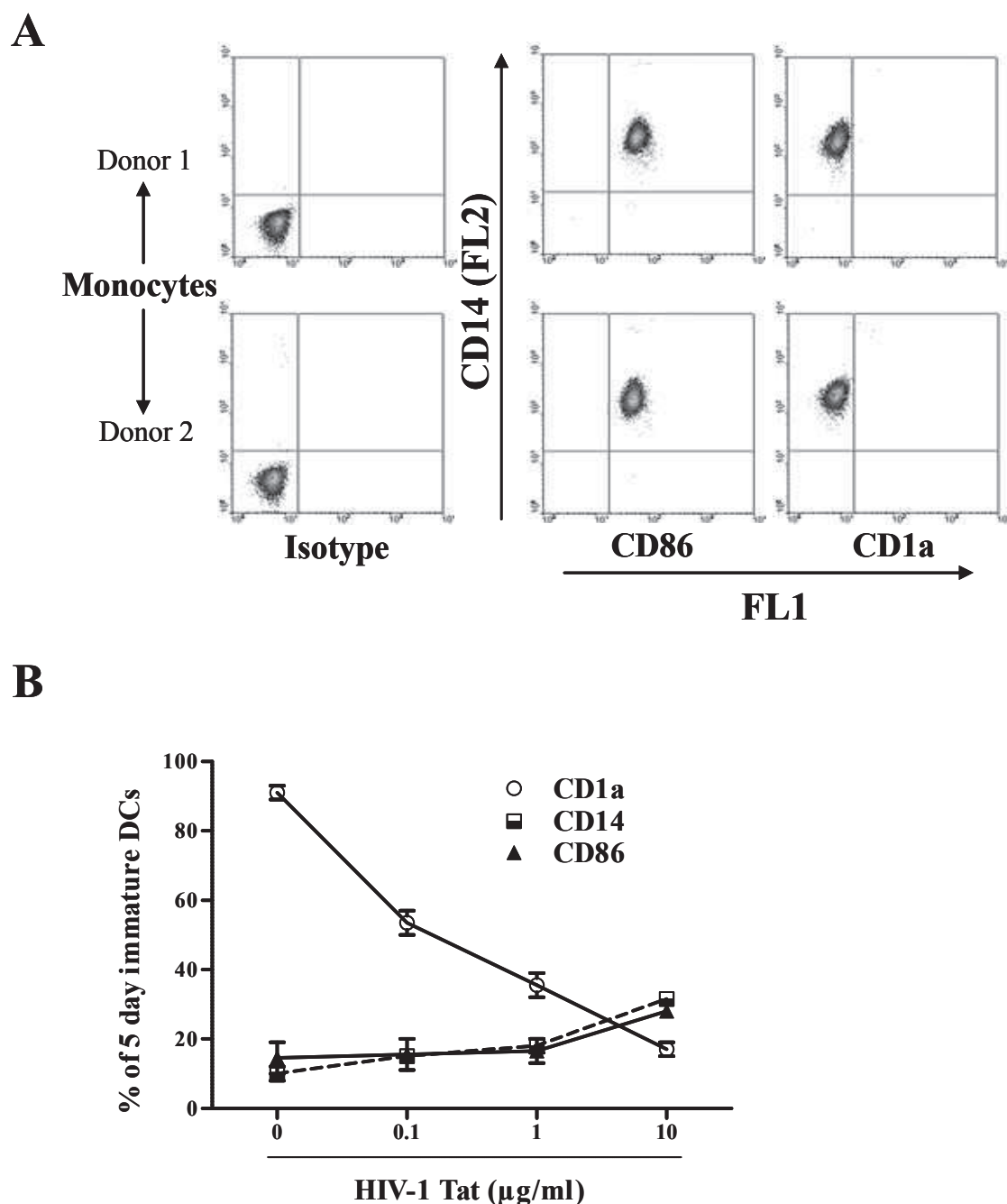


Figure 1. Evaluation de l'expression de CD1a et CD86 par les monocytes et DC immatures. Les monocytes humains ont été isolés des cellules mononucléées du sang périphérique par tri magnétique à l'aide de billes recouvertes d'anticorps anti-CD14 (technologie MACS; Myltenyi biotech, Bergish Gladbach, Allemagne). Les DC ont été

générées *in vitro* à partir des monocytes fraîchement isolés et cultivés, pendant 5 jours, en milieu complet en présence de 20 ng/mL GM-CSF et 20ng/mL IL-4 en l'absence ou en présence de Tat. **A.** Les monocytes fraîchement isolés n'expriment pas le récepteur membranaire CD1a. **B.** Analyse de l'expression de CD1a, CD14 et CD86 par les DC immatures générées ou non en présence Tat. La protéine Tat empêche l'acquisition de CD1a et favorise le maintien de l'expression de CD14 et une expression augmentée de CD86 par les DC immatures. Les résultats, représentatifs de six donneurs différents, sont exprimés en pourcentage des DC immatures exprimant le marqueur étudié en fonction de Tat (moyenne $\pm$ sd, n=4).

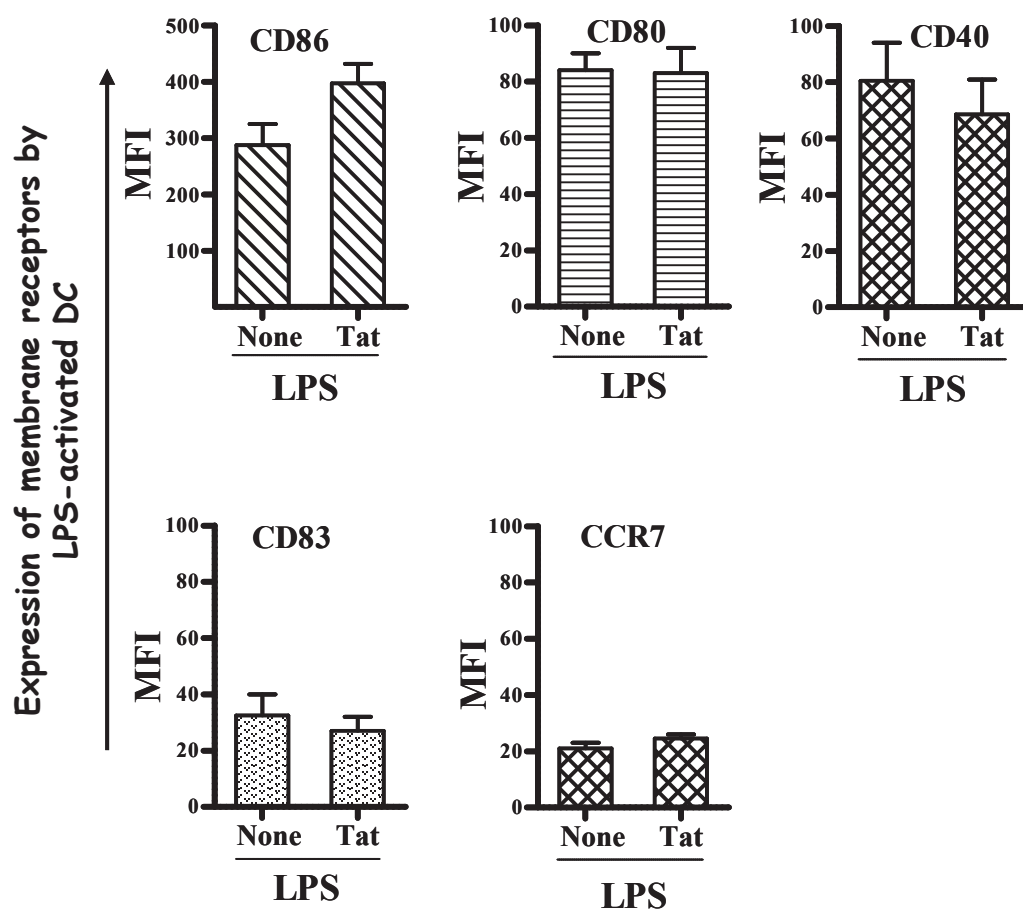


Figure 2. Evaluation de l'expression des récepteurs CD40, CD80, CD83, CD86 et CCR7 par les DC. Les DC de 5 jours générées ou non en présence de Tat (10 μ g/ml) sont activées, pendant 48 h, avec le LPS (25 ng/ml). L'expression des différents récepteurs est évaluée par cytométrie en flux en utilisant des anticorps spécifiques. Aucune différence significative n'a

été observée dans l'expression des marqueurs testés Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence moyenne (MFI) en fonction de la concentration de Tat (moyenne $\pm$ sd, n=5).

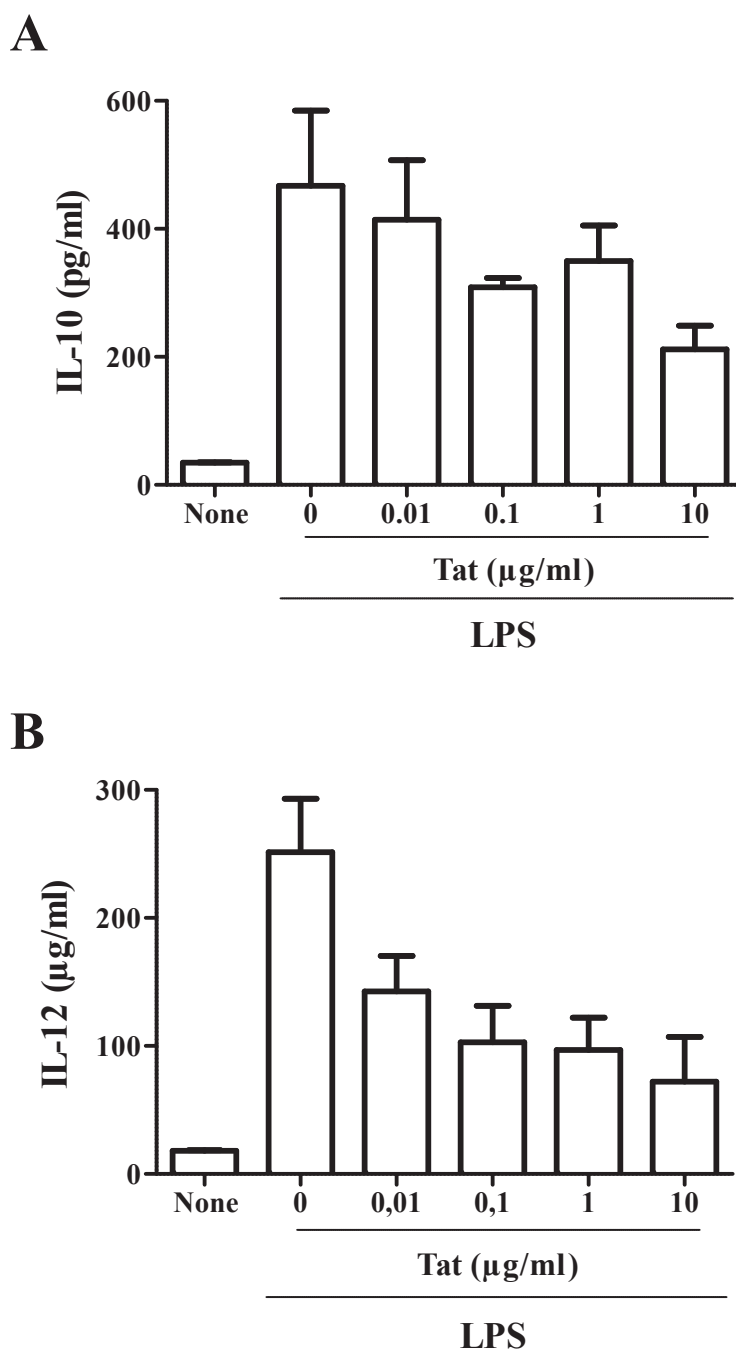
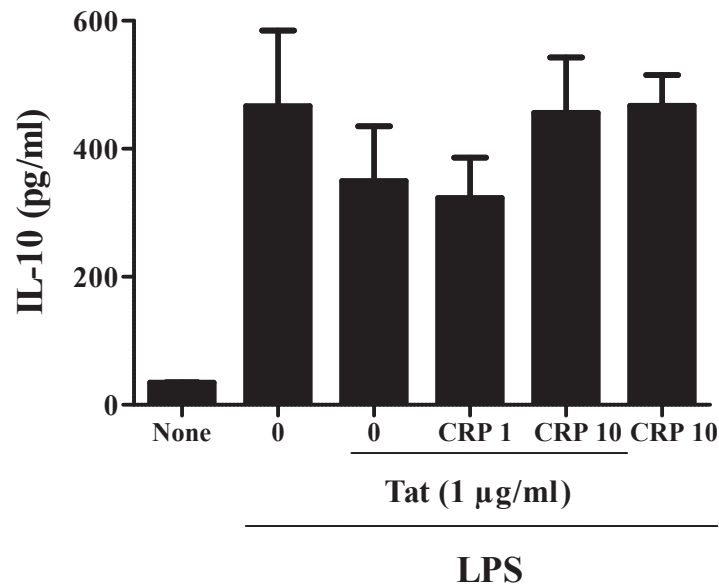


Figure 3. Evaluation de la production d'IL-10 et d'IL-12 par les DC générées ou non en présence de Tat. Les DC sont activées avec le LPS (25 ng/ml) pendant 48 h. La production d'IL-10 et d'IL-12 par les DC est évaluée par ELISA (kits Diaclone). La production d'IL-10 est diminuée (**A**) et celle d'IL-12 inhibée de façon dépendante de la dose (**B**) lorsque les DC ont été différenciées en présence de Tat en comparaison des cellules générées en son absence.

Les résultats sont exprimés en concentration d'IL-10 et d'IL-12 en fonction de Tat (moyenne $\pm$ sd, n=5). [Correspondances : CRP1 = 1 μ g/ml CRP ; CRP10 = 10 μ g/ml CRP)].

A



B

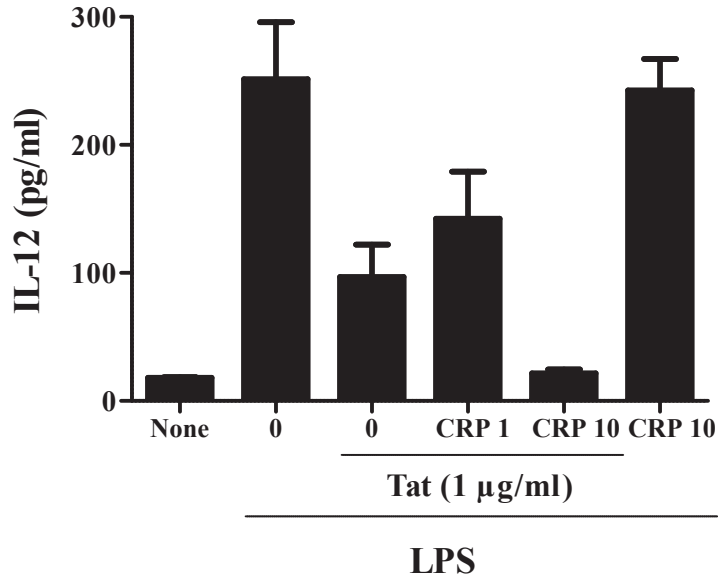


Figure 4. Evaluation de la production d'IL-10 et d'IL-12 par les DC en présence de Tat ou du complexe Tat/CRP. Les DC sont activées pendant 48 h, avec le LPS (25 ng/ml). La production d'IL-10 et d'IL-12 par les DC est évaluée par ELISA. **A.** La production d'IL-10 diminuée en présence de Tat est restaurée lorsque les DC ont été générées en présence du complexe Tat/CRP. L'association de Tat à CRP permet ainsi de maintenir les niveaux d'IL-10 produits par les cellules générées en l'absence de Tat. **B.** La production d'IL-12 reste inhibée

lorsque les DC ont été générées en présence du complexe Tat/CRP. L'association de Tat avec CRP inhibe la production d'IL-12, atteignant les niveaux de base des cellules générées en l'absence de Tat. Les résultats sont exprimés en concentration de cytokine en fonction de Tat (moyenne $\pm$ sd, n=5). [Correspondances : CRP1 = 1 μ g/ml CRP ; CRP10 = 10 μ g/ml CRP)].

MANUSCRIT 2 – EN PRÉPARATION

IL-1 β , IL-6 et IL-21 favorisent l'expression de CD16 par les monocytes, macrophages et cellules dendritiques myéloïdes

The pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and IL-21 favour the expression of CD16 by myeloid monocytes, macrophages, and dendritic cells

Ulrick Mavoungou Bigouagou^{1,2}, Isabelle Frémeaux^{1,2}, Simon Blanchard^{1,2,3}, Pascale Jeannin^{1,2,3}, Yves Delneste^{1,2,3}

¹ Inserm, Unité 892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, Angers, France

² UMR_S892, Université d'Angers, Angers, France

³ Laboratoire d'Immunologie et d'Allergologie, CHU Angers, Angers, France

Introduction

Les récepteurs aux immunoglobulines G (Fc γ R) sont exprimés par de nombreux types cellulaires, tels que les cellules NK, les mastocytes, les polynucléaires (basophiles, éosinophiles, neutrophiles), les plaquettes, les lymphocytes B, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (dendritic cells ou DC) [398]. Ils représentent un lien essentiel entre le bras humoral et le bras cellulaire de la réponse immunitaire. En effet, la réticulation des Fc γ R induite par la fixation des IgG à leur cible antigénique induit différents types de réponses effectrices telles que la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ou ADCC), la phagocytose, la sécrétion de métabolites de l'oxygène (ROI) et de médiateurs inflammatoires. La capture des antigènes via les IgG fixées aux Fc γ R des cellules présentatrices d'antigène (CPA) permet également d'induire leur présentation dans les molécules de CMH de classe I et de classe II.

La nature des réponses dépend, entre-autre, de l'expression différentielle des Fc γ R par les différents types cellulaires [399]. La diversité des fonctions médiées par les Fc γ R est

également liée à des polymorphismes génétiques [400], à la génération de formes solubles des FcγR [401], et des synergies établies avec d'autres systèmes de récepteurs [402].

Les FcγR sont classés en trois familles [FcγRI ou CD64, FcγRII ou CD32 et FcγRIII ou CD16] en fonction de leur affinité pour les IgG. FcγRI et FcγRIII sont des récepteurs activateurs formant des complexes multimériques avec la sous-unité de transduction du signal (chaîne γ) caractérisée par la présence d'un motif activateur (ITAM) dans sa partie cytoplasmique [403]. La famille FcγRII se distingue des autres FcγR par la diversité des séquences présentes dans sa partie cytoplasmique qui définissent plusieurs isoformes présentant des capacités différentes d'endocytose, de phagocytose et de signalisation. Les isoformes FcγRIIa et FcγRIIb se distinguent également par la présence, respectivement, de motifs de signalisation activateurs (ITAM) et inhibiteurs (ITIM) [404].

Les monocytes représentent une population cellulaire hétérogène de cellules. Les monocytes « classiques » sont caractérisés par une expression constitutive de CD14 et l'absence d'expression de CD16. Cependant, une population de monocytes exprimant la molécule CD16 et de faibles niveaux de CD14 a été décrite [405]. Comparativement aux monocytes CD14⁺ CD16⁻, ces cellules expriment des niveaux élevés des molécules HLA-DR, « epidermal growth factor module-containing mucin-like receptor 2 » (EMR2), « Ig-like transcript 4 » (ILT-4), CD43 et CD45RA [406-409]. De plus, une fraction des monocytes CD14⁺ CD16⁺ exprime également la molécule MDC8 [409].

Les monocytes sont des cellules plastiques qui peuvent se différencier en macrophages ou en DC, selon la nature des signaux qu'ils reçoivent. Les DC générées à partir des monocytes CD14⁺ CD16⁺ induisent préférentiellement des réponses cellulaires de type Th2 [410]. Les monocytes CD14⁺ CD16⁺ se différencient en DC présentant des propriétés de stimulation allogénique élevées [13]. La stimulation de monocytes CD14⁺ CD16⁺ par un ligand de TLR2 induit la génération préférentielle de DC CD1b⁺ ayant une grande capacité de présentation antigénique [411]. Collectivement, ces données suggèrent que la sous-population de monocytes CD14⁺ CD16⁺ présente des propriétés immunitaires particulières. Le but de cette étude a été d'évaluer la régulation par les cytokines de l'expression de CD16 par les monocytes, macrophages et DC humaines.

Principaux résultats

La capacité des cytokines à moduler l'expression de CD16 a été évaluée sur les monocytes totaux et les monocytes CD14⁺ CD16⁻, ainsi que sur les macrophages et DC générés à partir de ces cellules. Les monocytes ont été isolés du sang de donneurs sains (EFS Pays de la Loire, Angers, France) par tri magnétique positif (technologie Miltenyi) ; la pureté était en moyenne >98%. Les monocytes sont maintenus en culture en présence de 2 ng/ml GM-CSF. Les DC et les macrophages ont été générés à partir de monocytes cultivés, respectivement, en présence de 25 ng/ml IL-4 + 25 ng/ml GM-CSF et 20 ng/ml M-CSF + 2 ng/ml GM-CSF.

Les cellules ont été activées en présence de différentes cytokines et l'expression de CD16 a été évaluée par cytométrie en flux.

Nous avons montré que, parmi les 22 cytokines testées, seules les molécules IL-1 β , IL-6, IL-10 et IL-21 augmentent l'expression de CD16 sur les monocytes, les macrophages et les DC. Les niveaux d'expression de CD16 varient d'une cytokine à l'autre. Nous avons également observé que la cinétique d'acquisition de CD16 est variable d'une cytokine à l'autre et différente en fonction du type cellulaire.

Les cytokines IL-1 β , IL-6, IL-10 et IL-21 induisent l'acquisition de CD16 par les monocytes CD14⁺ CD16⁻. Cette acquisition est dépendante du temps et de la concentration de cytokines. Toutefois, l'augmentation de CD16 est 2 fois plus importante sur les monocytes totaux que sur les monocytes CD14⁺ CD16⁻, suggérant que l'augmentation de CD16 sur les monocytes totaux serait le fait de l'acquisition de CD16 par les monocytes CD14⁺ CD16⁻ et non d'une augmentation d'expression de CD16 sur les monocytes CD14⁺ CD16⁺.

Les DC acquièrent l'expression de CD16 lorsqu'elles sont activées par IL-1 β , IL-6, IL-10 et IL-21. Pour déterminer si les DC générées à partir de monocytes totaux et de monocytes CD14⁺ CD16⁻ présentent des caractéristiques phénotypiques différentes, nous avons évalué l'expression de marqueurs membranaires CD1a, CD14 et CD86 sur les DC immatures. Nous avons ensuite évalué la production d'IL-10 et d'IL-12 ainsi que l'expression de CD40, CD80, CD83 et CD86 en réponse au LPS. Les résultats montrent que l'expression des différents marqueurs, avant ou après activation avec le LPS, est équivalente sur les DC générées à partir des monocytes totaux et de monocytes CD14⁺ CD16⁻. Cependant, les DC générées à partir des monocytes totaux produisent 2 fois plus d'IL-10 et d'IL-12 que celles dérivées des monocytes CD14⁺ CD16⁻ après stimulation par le LPS.

Nous n'avons également observé aucune différence phénotypique des macrophages, à l'exception de la production d'IL-10 significativement plus élevée pour les macrophages issus de monocytes totaux.

Ces résultats montrent que les cytokines IL-1 β , IL-6, IL-10 et IL-21 augmentent l'expression de CD16 par les monocytes, les macrophages et DC et suggèrent un rôle de ces cytokines dans la modulation de la fréquence de monocytes CD14⁺ CD16⁺ au cours de la réponse immunitaire.

**The pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and IL-21 favour the expression of CD16
by human monocytes, macrophages, and dendritic cells**

Ulrick Mavoungou Bigouagou^{1,2}, Isabelle Frémeaux^{1,2}, Simon Blanchard^{1,2,3}, Pascale Jeannin^{1,2,3}, Yves Delneste^{1,2,3}

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes Angers, Angers, France

² UMR_S 892, Université d'Angers, Angers, France

³ Laboratoire d'Immunologie et d'Allergologie, CHU d'Angers, Angers, France

Corresponding author: Yves Delneste, Inserm Unit 892, University Hospital of Angers, Bâtiment Montéclair, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France

e-mail address: yves.delneste@univ-angers.fr

Tel: +33 (0) 244 688 300

Fax: +33 (0) 244 688 203

Abstract

Immunoglobulins receptors (Fc γ receptors or Fc γ R) play a central role in immune response, as they link the humoral and cellular components of immunity. The engagement of Fc γ R by IgG-antigen complexes initiates a complex range of immunoregulatory processes. The aim of this study was to evaluate the regulation of Fc γ RIII (CD16) expression by human monocytes, macrophages and dendritic cells (DC) in response to cytokines. Results showed that among the molecules tested; only the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and IL-21 and the anti-inflammatory cytokine IL-10 increased the expression of CD16 on monocytes and macrophages. Moreover, they induced the acquisition of CD16 by DC and CD14⁺ CD16⁻ monocytes. Finally, CD16-expressing monocyte-derived DC produce lower levels of IL-12 and IL-10 compared to DC generated from total monocytes. These data suggest that IL-1 β , IL-6, IL-10 and IL-21 regulate the expression of CD16 by human monocytes, macrophages and dendritic cells.

Introduction

The binding of IgG to Fc γ receptors (Fc γ R) mediate key immune functions. Fc γ receptors are structurally related molecules. They belong to the Ig superfamily and exhibit multiple Ig-like domains. Fc γ receptors are classified into three groups: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) and Fc γ RIII (CD16) which exhibit distinct structural and functional properties. Fc γ RI binds monomeric IgG with a high affinity. Fc γ RI is constitutively expressed by monocytes, macrophages and myeloid progenitor cells [1]. Unlike Fc γ RI, Fc γ RII and Fc γ RIII display low affinity for monomeric IgG. Fc γ RII and Fc γ RIII bind aggregated IgG through multimeric low-affinity and high-avidity interactions, which are important in the binding of antibody-antigen complexes. Fc γ RIII is encoded by the FCGR3A and FCGR3B genes. Fc γ RIIIa and Fc γ RIIIb share high levels of sequence homology but exhibit distinct structural characteristics. Fc γ RIIIa is a transmembrane protein that associates with the Fc γ chain. In contrast, Fc γ RIIIb is post-translationally processed as a GPI-anchored protein lacking transmembrane and intracellular domains. This difference results from a gene duplication followed by point mutation in the membrane proximal region of the extracellular domain that created a GPI-anchor signal sequence. The Fc γ RIIIa isoform is expressed by several leukocyte cell types, including macrophages, NK cells and subsets of T cells and monocytes, while constitutive Fc γ RIIIb expression is restricted to neutrophils [2].

The binding affinity of Fc γ RIII for IgG subclasses is affected by single nucleotide polymorphisms. Allelic Fc γ RIIIa variants having either a valine (V) or a phenylalanine (F) at position 158 are co-dominantly expressed. This single amino acid substitution increases the affinity of the V158 allotype for IgG1 and IgG3 compared to F158 and confers the capacity to bind IgG4 [3;4]. Furthermore, IgG-induced NK cell activation is significantly increased in 158V/V compared to 158F/F individuals. Fc γ RIIIb is characterized by the presence of the human neutrophil antigen (HNA or NA), a polymorphic variant that comprises four non-synonymous and one synonymous mutations within the membrane distal Ig-like domain of the receptor. These differences between the two NA allotypes (NA1 or HNA-1a and NA2 or HNA-1b) modify the N-linked glycosylation of the receptor and, consequently, affect the affinity for IgG subclasses. In particular, the NA1 allotype displays increased binding and phagocytosis of IgG1- and IgG3-coated particles and exhibits higher affinity for IgG3 compared to the NA2 allotype [5]. Apart from NA-1 and NA-2, the SH polymorphism (also called HNA-1c) has been added to the NA family of Fc γ RIIIb polymorphisms [6]. The SH allele determines the alanine to aspartic acid substitution at position 78 (A78D) and is linked

mainly to the NA2 allele; however, the precise role of this polymorphism in IgG binding is unknown.

Monocytes can be divided into two subclasses based on differential expression levels of CD14 and CD16 (FcγRIII) [7]. CD14^{hi} CD16⁻ monocytes represent 90-95 % of the total monocytes in healthy individuals. The CD14⁺ CD16⁺ subpopulation (5-10 % of total monocytes) produce low levels of IL-10 in response to a TLR4 agonist and high amounts of TNFα in response to TLR4 and TLR2 agonists [8; 9; 10]. In a model of transendothelial trafficking, CD14⁺ CD16⁺ monocytes have been shown to differentiate into dendritic cells (DC), suggesting that they might represent the physiologically relevant blood precursors of migrating DC [11]. Monocyte subpopulations also differ by means of other surface molecules such as the chemokine receptors CCR5 and CX3CR1, which are highly expressed on the CD14⁺ CD16⁺ cells, while CCR2 and lower levels of CX3CR1 characterize the classical CD14^{hi} CD16⁻ monocytes [12; 13; 14].

The frequency of CD14⁺ CD16⁺ monocytes increases during inflammation (such as rheumatoid arthritis) [15], diabetes [16; 17] or during infections [18; 19; 20]. However, the mechanisms responsible for the modulation of the number of CD14⁺ CD16⁺ monocytes are not elucidated. This study aimed to analyze the ability of cytokines to regulate the expression of CD16 by human monocytes, macrophages and DC.

Material and methods

Reagents. The cytokines IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-10, IL-12 and IL-17E were from Immunotools and the cytokines IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-13, IL-15, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-26, IL-28A, IL-29 and IL-31 were from R&D systems. FITC-labeled anti-CD16, -CD40, -CD64, -CD80, -CD83 and -CD86 mAbs antibodies were from BD Pharmingen. PE-labeled anti-CD14 (DAKO) and FITC-labeled anti-CD32 (Serotec) mAbs were purchased from the indicated manufacturers. FITC-labeled IgG1 and PE-labeled IgG2a isotype controls were obtained from BD Pharmingen. LPS was purchased from Sigma-Aldrich.

PBMC isolation and cell generation. Blood samples from healthy subjects were obtained from the EFS Pays de la Loire (Angers, France) in accordance with the Angers University Hospital ethical committee requirements. PBMC were isolated from blood by standard Ficoll-Paque density-gradient (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) and resuspended in complete medium consisting in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non essential amino acids, 10 mM Hepes, and antibiotics (all from Cambrex). Monocytes were isolated from PBMC by magnetic sorting using anti-CD14 mAb-coated microbeads (Myltenyi biotec, Bergish Gladbach, Germany). Dendritic cells (DC) were generated in vitro by culturing monocytes for 5 days in complete medium containing 20 ng/ml GM-CSF and 20 ng/ml IL-4 (both from R&D Systems). Macrophages were generated in vitro by culturing monocytes for 5 days in complete medium containing 2 ng/ml GM-CSF and 20 ng/ml M-CSF (R&D Systems).

Monocyte subpopulations separation. Freshly isolated monocytes were incubated with FITC-labeled anti-CD16 mAb (clone 3G8) for 30 min at 4°C. CD16⁻ monocytes were isolated by FACS sorting using a FACS Aria cytometer.

Cytokine production by macrophages and DC. DC and macrophages generated from total CD14⁺ monocytes and from the CD14⁺ CD16⁻ subpopulation were stimulated for 48 h with 25 ng/ml and 200 ng/ml LPS, respectively. After activation, supernatants were harvested to assess cytokine production and cells were collected for membrane receptor expression by FACS. IL-10 and IL-12 production was evaluated using ELISA from Diaclone (Besançon, France).

Analysis of CD16 mRNA expression by RT-PCR. CD16 mRNA expression was evaluated by RT-PCR in total monocytes, macrophages and DC stimulated or not for 48 h with IL-1 β , IL-6, IL-10 or IL-21. Total RNA was extracted from using TRIzol[®] reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. CD16 mRNA expression was analyzed using specific primers (F: 5' GGC CTC GAG CTA CTT CAT TG 3'; R: GGT TGA CAC TGC CAA ACC TT 3'); mRNA quality was evaluated by amplifying GAPDH cDNA (F: 5' GAA GGT GAA GGT CGG AGT C 3'; R: 5' GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC 3').

Results and Discussion

IL-1 β , IL-6, IL-21 potentiate CD16 expression by human monocytes, macrophages and DC. CD16 expression by myeloid cells was determined by FACS. CD16 is constitutively expressed by a subpopulation of monocytes and macrophages, but not by immature DC. Among the cytokines tested, only the pro-inflammatory IL-1 β , IL-6 and IL-21 and the anti-inflammatory IL-10 cytokines increased, in a dose-dependent manner, CD16 expression by human monocytes, macrophages, and induced CD16 expression on DC (Fig. 1A and data not shown). The increase of CD16 expression was time-dependent and different from one to one cytokine (Fig. 1C-E). The induction of CD16 expression on DC by IL-1 β , IL-6, IL-10 and IL-21 is consecutive to an induction of mRNA expression (Fig. 1B). The acquisition of CD16 was more important when immature DCs were cultured for 48 h with IL-1 β (Fig. 1E).

Up to now, only a limited number of cytokines has been shown to regulate Fc γ R expression on immune cells. IFN- γ and IL-10 have been reported to increase human Fc γ RI-III while, in contrast, TGF- β and IL-4/IL-13 decreased their expression [2; 21]. IL-1 β and IL-6 are key mediators of inflammation. Moreover, the number of CD14⁺ CD16⁺ monocytes is increased in some inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis and HIV infection ([15; 19; 20]. The presence of IL-6 and IL-1 β during inflammation may thus participate to the increase of CD14⁺ CD16⁺ monocytes during some infections. Moreover, human circulating CD16-expressing myeloid DC exhibit a strong proinflammatory activity, whereas CD1c myeloid DC appeared to be mainly involved in chemotaxis [22].

IL-1 β , IL-6, IL-10 and IL-21 induce CD16 on CD14⁺ CD16⁻ monocytes. To determine whether the increase of CD16 expression observed on total monocytes may result from the acquisition of CD16 by CD14⁺ CD16⁻ monocytes, this population was isolated by FACS sorting (annexe 4) and assessed for CD16 expression upon cytokine stimulation. Results showed that the cytokines not only increased CD16 expression on total monocytes (Fig. 2A) but also induced the acquisition of CD16 by CD14⁺ CD16⁻ monocytes (Fig. 2B). FACS analysis showed that total monocytes expressed twice as much CD16 as the CD14⁺ CD16⁻ monocyte subset, suggesting that the increase of CD16 expression on total monocytes was not due to an increase of CD16 expression by CD14⁺ CD16⁺ monocytes but to an acquisition of CD16 by CD14⁺ CD16⁻ monocytes.

These results suggest that IL-6, IL-1 β , IL-10 and IL-21, which expression is increased during inflammation, may play an important role in the increase of CD14⁺ CD16⁺ monocytes during inflammation.

CD16⁻ and CD16⁺ DC produce different levels of cytokines. We next evaluated whether DC generated from total monocytes or from CD14⁺ CD16⁻ monocytes showed phenotypic differences. Results showed that both immature and mature DC, generated either from total or from CD14⁺ CD16⁻ monocytes, exhibit similar levels of CD1a and CD14 (Fig. 3A&B), and CD40, CD80, CD83 and CD86 (Fig. 4A-D). In contrast, DC generated from total monocytes produced higher levels of IL-10 and IL-12 compared with DC generated from CD14⁺ CD16⁻ monocytes (Fig. 4F). Macrophages generated from the same cells, as for DC, exhibit similar levels in CD1a and CD14 expression. However, macrophages obtained from total monocytes produce higher levels of IL-10 compared with macrophages generated from CD14⁺ CD16⁻ monocytes (Fig. 4E).

The number of CD14⁺ CD16⁺ monocytes is dramatically increased in a variety of systemic diseases, including hemolytic uremic syndrome, bacterial sepsis, and HIV [18; 25; 26; 27; 28; 29]. A similar increase in the number of CD14⁺ CD16⁺ monocytes has been also observed during localized infections. In a localized skin infection caused by *Leishmania braziliensis*, monocytes express higher levels of CD16 and the increase of CD14⁺ CD16⁺ monocytes correlated with larger lesion size and with elevated levels of circulating TGF β [30]. As TGF β has been previously reported to induce CD16 expression on monocytes [31], the authors suggested that the production of TGF β was responsible for the induction of CD16. In our experiments, we did not observe any modulation of CD16 by TGF β . The potential role of the immunoregulatory cytokine IL-10, which plays a key role in the pathogenesis of human visceral leishmaniasis [32; 33] and reported to increase CD16 expression on human monocytes [34], was not evaluated by the authors. During erysipelas, a skin infection caused by β -hemolytic Group A streptococci, an elevation in CD14⁺ CD16⁺ monocytes was observed; these cells produce lower levels of TNF α relative to cells from healthy subjects [35]. In contrast, an elevation on CD16 expression on monocytes was associated with elevated serum TNF α levels during pulmonary tuberculosis [36]. It may therefore be an oversimplification to state unequivocally that the CD14⁺ CD16⁺ monocytes act as proinflammatory monocytes. Moreover, CD14⁺ CD16⁺ monocytes have been described as an important source of circulating DC. CD16 has been also involved in the recognition of immune complexes and in antigen presentation [37; 38].

In conclusion, this study highlights the role of IL-1 β , IL-6, IL-10 and IL-21 in the acquisition and potentiation of CD16 expression by human monocytes, macrophages and DC. The increase induced in total monocytes was related, at least in part, to an acquisition of CD16 by the CD14⁺ CD16⁻ subpopulation. Together, these data suggest that IL-1 β , IL-6, IL-10 and IL-21 may be involved in the increase of CD16 expression observed during inflammation or some infections and that these cytokines may modulate the CD16-mediated immune functions.

Bibliography

- [1] L.K. Ernst, A.M. Duchemin, K.L. Miller, and C.L. Anderson, Molecular characterization of six variant Fc gamma receptor class I (CD64) transcripts. *Mol Immunol* 35 (1998) 943-54.
- [2] F. Nimmerjahn, and J.V. Ravetch, Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol* 96 (2007) 179-204.
- [3] H.R. Koene, M. Kleijer, J. Algra, D. Roos, A.E. von dem Borne, and M. de Haas, Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* 90 (1997) 1109-14.
- [4] J. Wu, J.C. Edberg, P.B. Redecha, V. Bansal, P.M. Guyre, K. Coleman, J.E. Salmon, and R.P. Kimberly, A novel polymorphism of Fc gammaRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest* 100 (1997) 1059-70.
- [5] J.E. Salmon, J.C. Edberg, and R.P. Kimberly, Fc gamma receptor III on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities. *J Clin Invest* 85 (1990) 1287-95.
- [6] J. Bux, E.L. Stein, P. Bierling, P. Fromont, M. Clay, D. Stroncek, and S. Santoso, Characterization of a new alloantigen (SH) on the human neutrophil Fc gamma receptor IIIb. *Blood* 89 (1997) 1027-34.
- [7] D. Strauss-Ayali, S.M. Conrad, and D.M. Mosser, Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol* 82 (2007) 244-52.
- [8] M.J. Kwakkenbos, G.W. Chang, H.H. Lin, W. Pouwels, E.C. de Jong, R.A. van Lier, S. Gordon, and J. Hamann, The human EGF-TM7 family member EMR2 is a heterodimeric receptor expressed on myeloid cells. *J Leukoc Biol* 71 (2002) 854-62.
- [9] D.S. Allan, M. Colonna, L.L. Lanier, T.D. Churakova, J.S. Abrams, S.A. Ellis, A.J. McMichael, and V.M. Braud, Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells. *J Exp Med* 189 (1999) 1149-56.
- [10] G. Rothe, H. Gabriel, E. Kovacs, J. Klucken, J. Stohr, W. Kindermann, and G. Schmitz, Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16 (1996) 1437-47.
- [11] J. Almeida, C. Bueno, M.C. Alguero, M.L. Sanchez, M. de Santiago, L. Escribano, B. Diaz-Agustin, J.M. Vaquero, F.J. Laso, J.F. San Miguel, and A. Orfao, Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical, and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage(-)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(-/lo) cells, CD14(+) monocytes, and CD16(-) dendritic cells. *Clin Immunol* 100 (2001) 325-38.
- [12] M. Siedlar, M. Frankenberger, L.H. Ziegler-Heitbrock, and K.U. Belge, The M-DC8-positive leukocytes are a subpopulation of the CD14+ CD16+ monocytes. *Immunobiology* 202 (2000) 11-7.
- [13] H.W. Ziegler-Heitbrock, G. Fingerle, M. Strobel, W. Schraut, F. Stelter, C. Schutt, B. Passlick, and A. Pforte, The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol* 23 (1993) 2053-8.
- [14] E. Grage-Griebenow, D. Lorenzen, R. Fetting, H.D. Flad, and M. Ernst, Phenotypical and functional characterization of Fc gamma receptor I (CD64)-negative monocytes, a minor human monocyte subpopulation with high accessory and antiviral activity. *Eur J Immunol* 23 (1993) 3126-35.

- [15] A.P. Cairns, A.D. Crockard, and A.L. Bell, The CD14⁺ CD16⁺ monocyte subset in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 21 (2002) 189-92.
- [16] G. Bouma, W.K. Lam-Tse, A.F. Wierenga-Wolf, H.A. Drexhage, and M.A. Versnel, Increased serum levels of MRP-8/14 in type 1 diabetes induce an increased expression of CD11b and an enhanced adhesion of circulating monocytes to fibronectin. *Diabetes* 53 (2004) 1979-86.
- [17] R. Patino, J. Ibarra, A. Rodriguez, M.R. Yague, E. Pintor, A. Fernandez-Cruz, and A. Figueredo, Circulating monocytes in patients with diabetes mellitus, arterial disease, and increased CD14 expression. *Am J Cardiol* 85 (2000) 1288-91.
- [18] G. Fingerle, A. Pforte, B. Passlick, M. Blumenstein, M. Strobel, and H.W. Ziegler-Heitbrock, The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 82 (1993) 3170-6.
- [19] O. Lambotte, Y. Taoufik, M.G. de Goer, C. Wallon, C. Goujard, and J.F. Delfraissy, Detection of infectious HIV in circulating monocytes from patients on prolonged highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 23 (2000) 114-9.
- [20] K. Williams, S. Westmoreland, J. Greco, E. Ratai, M. Lentz, W.K. Kim, R.A. Fuller, J.P. Kim, P. Autissier, P.K. Sehgal, R.F. Schinazi, N. Bischofberger, M. Piatak, J.D. Lifson, E. Masliah, and R.G. Gonzalez, Magnetic resonance spectroscopy reveals that activated monocytes contribute to neuronal injury in SIV neuroAIDS. *J Clin Invest* 115 (2005) 2534-45.
- [21] F. Nimmerjahn, and J.V. Ravetch, Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 8 (2008) 34-47.
- [22] D. Piccioli, S. Tavarini, E. Borgogni, V. Steri, S. Nuti, C. Sammiceli, M. Bardelli, D. Montagna, F. Locatelli, and A. Wack, Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets. *Blood* 109 (2007) 5371-9.
- [23] I. Moldovan, J. Galon, I. Maridonneau-Parini, S. Roman Roman, C. Mathiot, W.H. Fridman, and C. Sautes-Fridman, Regulation of production of soluble Fc γ receptors type III in normal and pathological conditions. *Immunol Lett* 68 (1999) 125-34.
- [24] F. Pinheiro da Silva, M. Aloulou, D. Skurnik, M. Benhamou, A. Andremont, I.T. Velasco, M. Chiamolera, J.S. Verbeek, P. Launay, and R.C. Monteiro, CD16 promotes *Escherichia coli* sepsis through an FcR γ inhibitory pathway that prevents phagocytosis and facilitates inflammation. *Nat Med* 13 (2007) 1368-74.
- [25] G.C. Fernandez, M.V. Ramos, S.A. Gomez, G.I. Dran, R. Exeni, M. Alduncin, I. Grimoldi, G. Vallejo, C. Elias-Costa, M.A. Isturiz, and M.S. Palermo, Differential expression of function-related antigens on blood monocytes in children with hemolytic uremic syndrome. *J Leukoc Biol* 78 (2005) 853-61.
- [26] J.B. Allen, H.L. Wong, P.M. Guyre, G.L. Simon, and S.M. Wahl, Association of circulating receptor Fc γ RIII-positive monocytes in AIDS patients with elevated levels of transforming growth factor-β. *J Clin Invest* 87 (1991) 1773-9.
- [27] N. Thieblemont, L. Weiss, H.M. Sadeghi, C. Estcourt, and N. Haeffner-Cavaillon, CD14^{low}CD16^{high}: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *Eur J Immunol* 25 (1995) 3418-24.
- [28] I. Otani, H. Akari, K.H. Nam, K. Mori, E. Suzuki, H. Shibata, K. Doi, K. Terao, and Y. Yosikawa, Phenotypic changes in peripheral blood monocytes of cynomolgus monkeys acutely infected with simian immunodeficiency virus. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14 (1998) 1181-6.
- [29] W.K. Kim, S. Corey, X. Alvarez, and K. Williams, Monocyte/macrophage traffic in HIV and SIV encephalitis. *J Leukoc Biol* 74 (2003) 650-6.

- [30] G. Soares, A. Barral, J.M. Costa, M. Barral-Netto, and J. Van Weyenbergh, CD16+ monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased ex vivo levels and correlation with clinical data. *J Leukoc Biol* 79 (2006) 36-9.
- [31] G.R. Welch, H.L. Wong, and S.M. Wahl, Selective induction of Fc gamma RIII on human monocytes by transforming growth factor-beta. *J Immunol* 144 (1990) 3444-8.
- [32] C.L. Karp, S.H. el-Safi, T.A. Wynn, M.M. Satti, A.M. Kordofani, F.A. Hashim, M. Hag-Ali, F.A. Neva, T.B. Nutman, and D.L. Sacks, In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *J Clin Invest* 91 (1993) 1644-8.
- [33] H.W. Ghalib, M.R. Piuvezam, Y.A. Skeiky, M. Siddig, F.A. Hashim, A.M. el-Hassan, D.M. Russo, and S.G. Reed, Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J Clin Invest* 92 (1993) 324-9.
- [34] J.C. Calzada-Wack, M. Frankenberger, and H.W. Ziegler-Heitbrock, Interleukin-10 drives human monocytes to CD16 positive macrophages. *J Inflamm* 46 (1996) 78-85.
- [35] A. Horelt, K.U. Belge, B. Steppich, J. Prinz, and L. Ziegler-Heitbrock, The CD14+CD16+ monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production. *Eur J Immunol* 32 (2002) 1319-27.
- [36] G. Vanham, K. Edmonds, L. Qing, D. Hom, Z. Toossi, B. Jones, C.L. Daley, B. Huebner, L. Kestens, P. Gigase, and J.J. Ellner, Generalized immune activation in pulmonary tuberculosis: co-activation with HIV infection. *Clin Exp Immunol* 103 (1996) 30-4.
- [37] S.A. Minskoff, K. Matter, and I. Mellman, Fc gamma RII-B1 regulates the presentation of B cell receptor-bound antigens. *J Immunol* 161 (1998) 2079-83.
- [38] A. Regnault, D. Lankar, V. Lacabanne, A. Rodriguez, C. Thery, M. Rescigno, T. Saito, S. Verbeek, C. Bonnerot, P. Ricciardi-Castagnoli, and S. Amigorena, Fc gamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* 189 (1999) 371-80.

Figure legends

Figure 1. Analysis of CD16 expression by human monocytes, macrophages and DC. **A.** The expression of CD16 was evaluated on monocytes non stimulated or stimulated for 48 h with 25 ng/ml of the indicated cytokines. Results are expressed in MFI values (mean $\pm$ sd, n=6). **B.** Analysis of CD16 mRNA expression in monocytes, macrophages and DC activated or not with 25 ng/ml IL-1 β , IL-6, IL-10 and IL-21 for 24 h. GAPDH amplification was used as a control. Results are representative of five experiments. **C-E.** Kinetics analysis of CD16 expression (D1 to D5) on monocytes (**C**), macrophages (**D**) and DC (**E**) stimulated with 25 ng/ml IL-1 β , IL-6, IL-10 and IL-21. Results are expressed as a percentage of increase of CD16 expression (mean $\pm$ sd, n=5).

Figure 2. Analysis of CD16 expression by monocytes. The expression of CD16 was evaluated on total monocytes (**A**) and CD14⁺ CD16⁻ monocytes (**B**) in a time-dependent manner in response to a stimulation with 25 ng/ml IL-1 β , IL-6, IL-10 and IL-21. Results are expressed in MFI values (mean $\pm$ sd, n=5).

Figure 3. Analysis of the phenotype of monocyte-derived macrophages and DC. Analysis of membrane CD1a and CD14 expression by macrophages and DC generated from total monocytes (**A**) or from CD14⁺ CD16⁻ monocytes (**B**). Results are representative of one of five independent experiments.

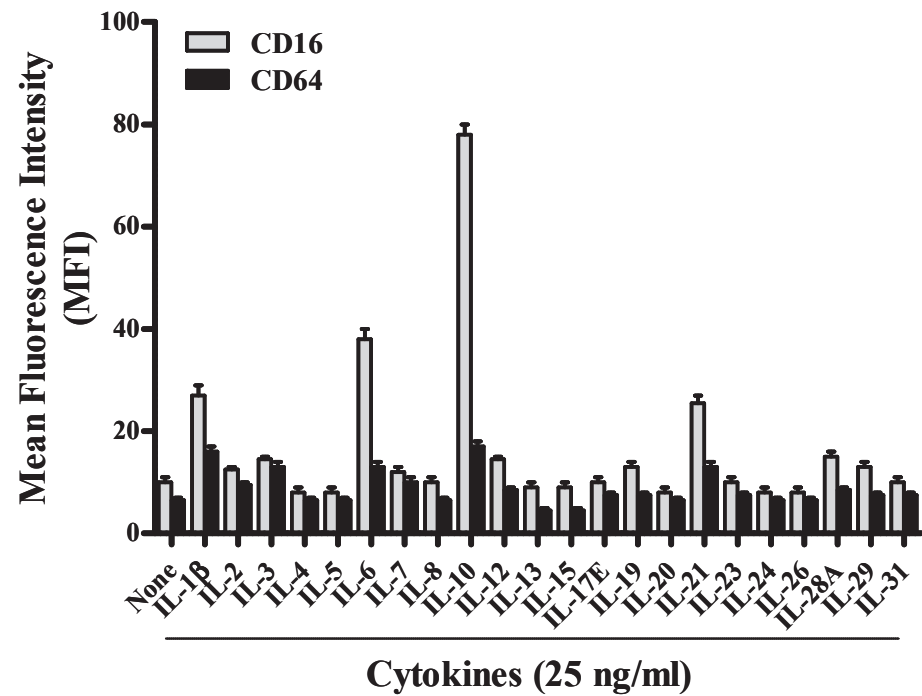
Figure 4. Analysis of membrane and cytokine phenotype by DC. The expression of CD40 (**A**), CD80 (**B**), CD83 (**C**) and CD86 (**D**) was evaluated on DC generated from total or CD14⁺ CD16⁻ monocytes, non stimulated or stimulated with LPS. Results are expressed in MFI values (mean $\pm$ sd, n=5). IL-10 and IL-12 production by macrophages (**E**) and DC (**F**) generated from total or CD14⁺ CD16⁻ monocytes, non stimulated or stimulated with LPS. Results are expressed in pg/ml (mean $\pm$ sd, n=4).

Correspondences

(CD14⁺)-DC and (CD14⁺)-M ϕ respectively correspond to DC and macrophages generated from total monocytes, and ((CD14⁺ CD16⁻)-DC and (CD14⁺ CD16⁻)-M ϕ respectively correspond to DC and macrophages differentiated from the CD14⁺ CD16⁻ monocyte subpopulation.

Figure 1

A



B

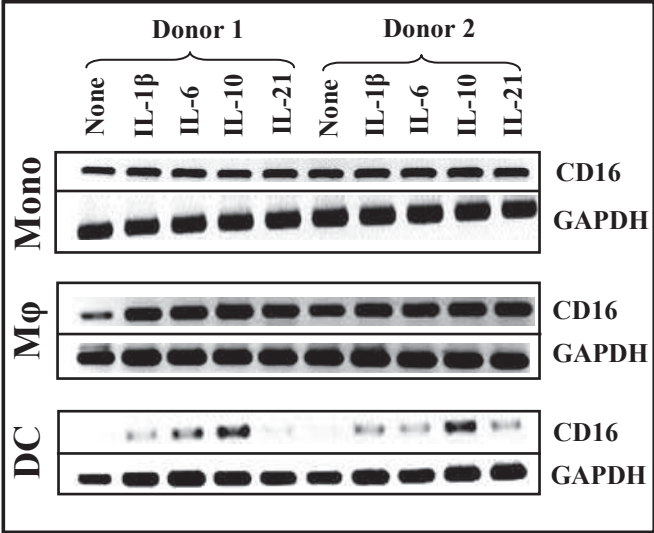
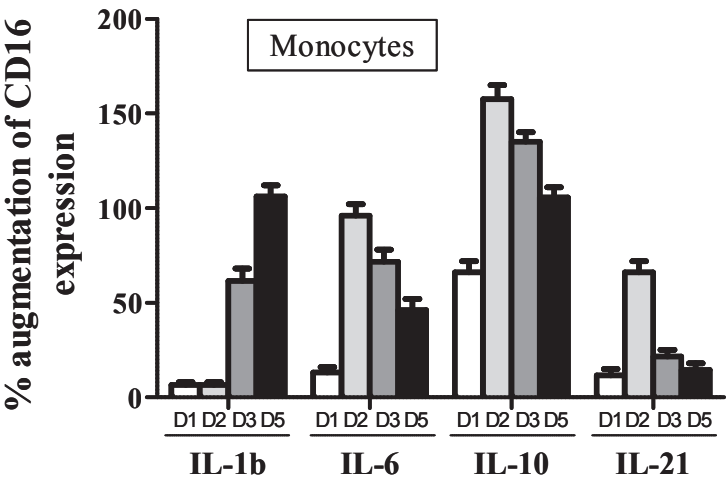
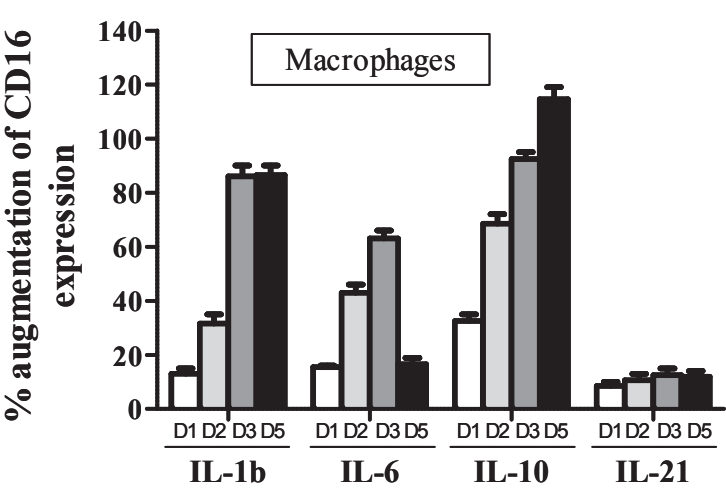


Figure 1

C



D



E

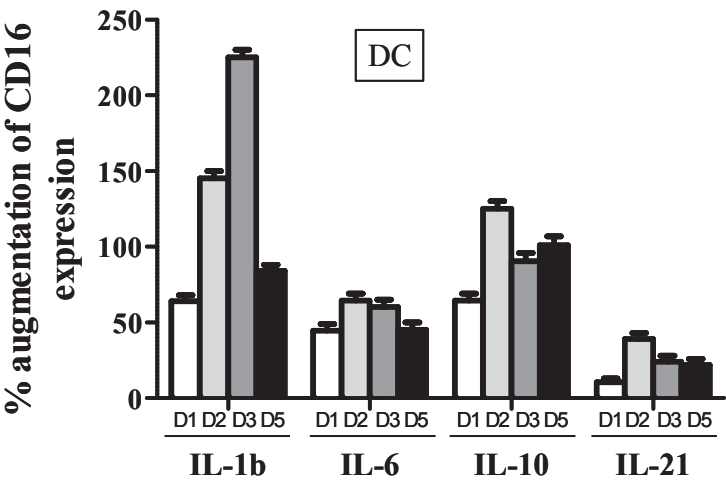
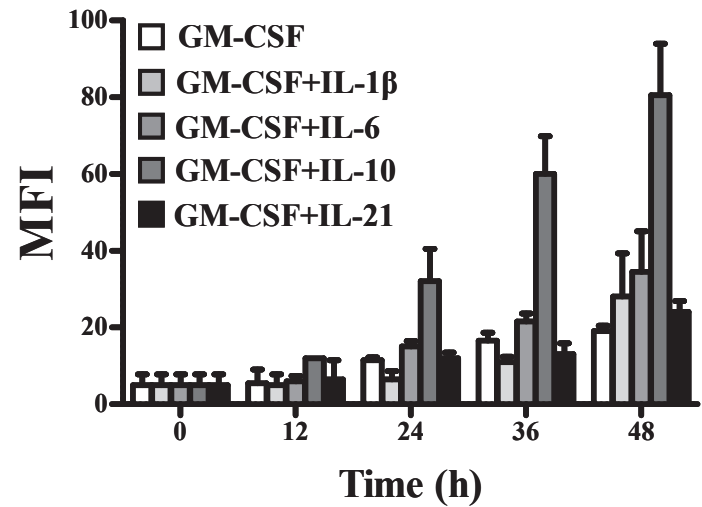


Figure 2

A



B

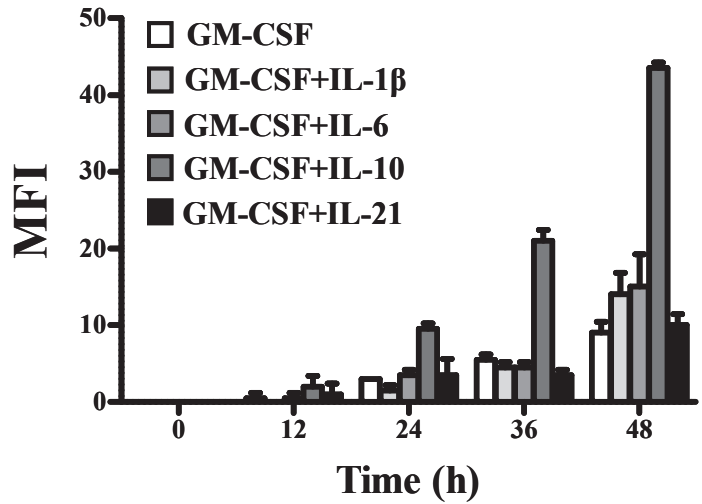


Figure 3

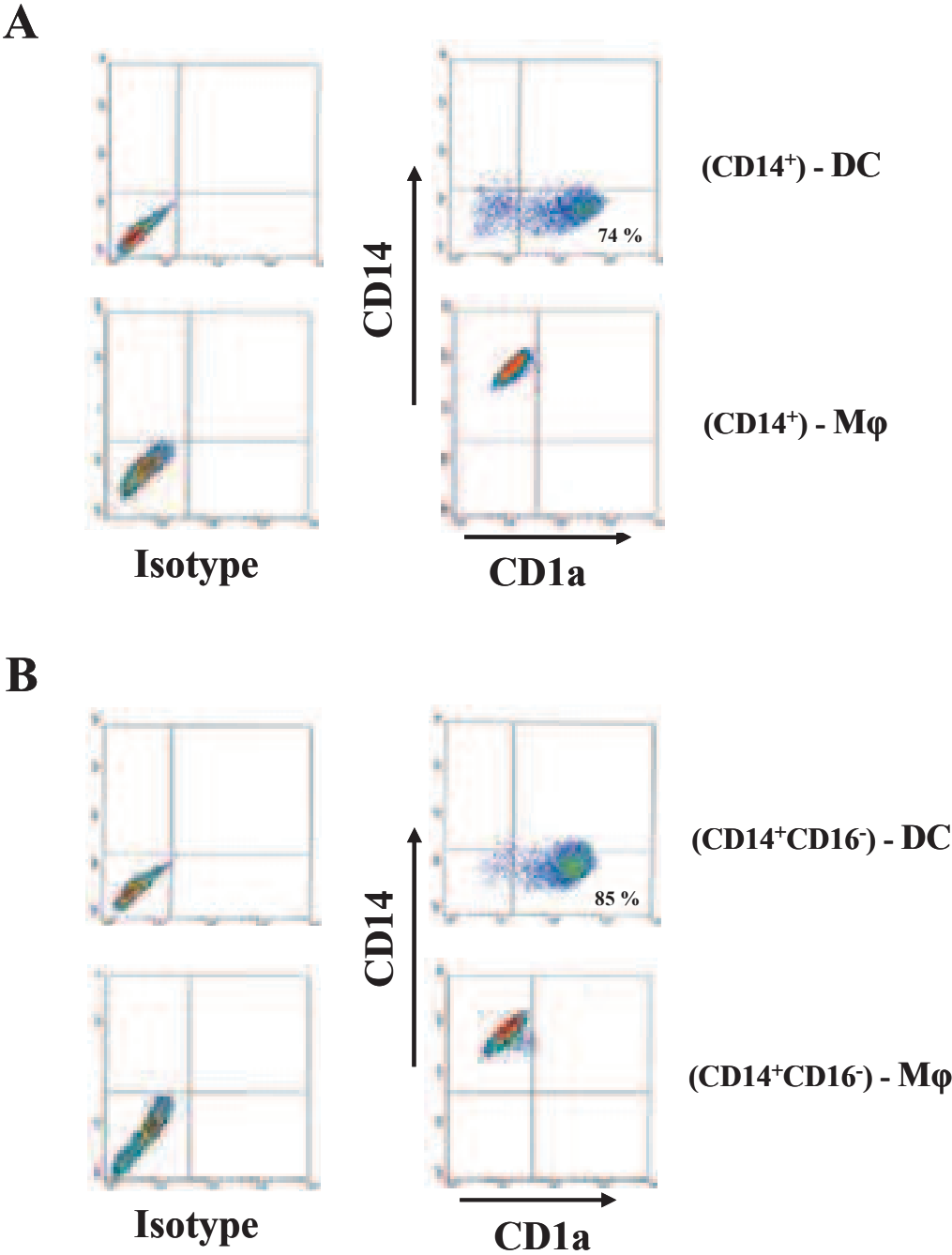
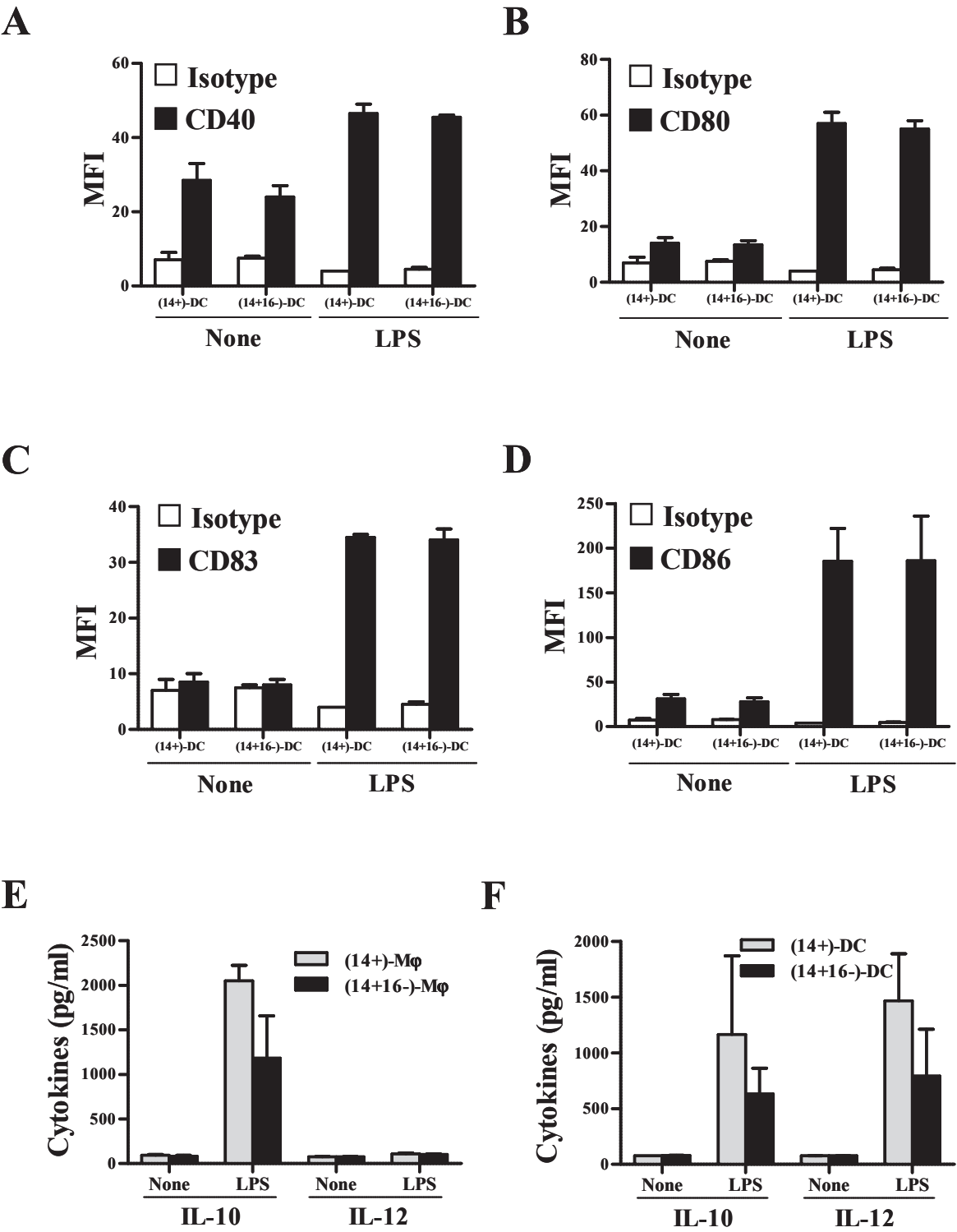


Figure 4



Discussion

L'immunité innée et l'immunité adaptative constituent les deux volets du système immunitaire. Alors que l'immunité acquise est dotée d'une mémoire immunologique et s'appuie sur une grande variabilité de récepteurs obtenus par réarrangements géniques, l'immunité innée intervient sans mémoire et avec la même intensité lors d'une nouvelle rencontre avec le même microorganisme. Le rôle de sentinelle de l'immunité innée lui permet non seulement d'assurer l'élimination des microbes, mais également de sensibiliser l'immunité adaptative à ceux-ci. Pour remplir ces fonctions, l'immunité innée s'appuie sur la composante cellulaire et la composante moléculaire.

L'activation des cellules de l'immunité innée implique des récepteurs associés aux cellules ou sécrétés, constituant la composante moléculaire de l'immunité innée. Ces récepteurs représentent une famille de molécules appelées « Pattern Recognition Receptors » ou PRR. Les PRR reconnaissent des motifs hautement conservés au cours de l'évolution, appelés « Pathogen-Associated Molecular Patterns » ou PAMP, et exprimés de façon exclusive par les microorganismes. Les PRR sont également capables de reconnaître les structures du soi modifié, telles que les cellules apoptotiques.

Les PRR associés aux cellules sont divisés en deux sous classes selon leur fonction d'endocytose ou de signalisation. Les PRR solubles constituent le bras humoral de l'immunité innée et agissent comme des ponts moléculaires entre le non soi ou le soi modifié et les phagocytes, facilitant ainsi la clairance microbienne ou des structures du soi modifié potentiellement immunogènes.

La famille des PRR solubles est essentiellement composée des collectines, ficolines et pentraxines. Les pentraxines représentent une famille de protéines divisée en deux sous classes en fonction de leur structure primaire: les pentraxines courtes et les pentraxines longues. Les pentraxines courtes « Serum Amyloid P » (SAP) et « C-Reactive Protein » (CRP) sont les protéines de la phase aiguë de l'inflammation produites par le foie. Les pentraxines longues sont constituées de « Pentraxin 3 » (PTX3) et de « Pentraxin 4 » (PTX4), décrite très récemment. Contrairement à SAP et CRP, la molécule PTX3 est produite par de nombreux types cellulaires, tels que les DC, les macrophages, les cellules épithéliales et les neutrophiles, en réponse à des médiateurs pro-inflammatoires (e.g IL-1 β , TNF α , composants microbiens) ; mais par le foie.

La détection de virus ou des composants viraux par les cellules de l'immunité innée implique des PRR solubles et des PRR associés aux cellules. La reconnaissance virale peut avoir des

conséquences opposées, à savoir une réponse protectrice ou un échappement à la pression immunitaire.

La détection du VIH par l'immunité innée implique la mobilisation des PRR membranaires et solubles. La fusion du VIH avec la membrane plasmique des cellules cibles est médiée par l'interaction de sa glycoprotéine d'enveloppe gp120 avec CD4 ou DC-SIGN, et des récepteurs aux chimiokines. Ces interactions facilitent l'entrée et la dissémination du virus dans l'organisme d'individus infectés [51]. La molécule gp120 interagit également avec la lectine sérique MBL, facilitant ainsi l'élimination du virus par le complément [412].

La molécule Tat du VIH est une protéine multifonctionnelle qui joue un rôle crucial dans la réplication virale et contribuerait à plusieurs des symptômes pathologiques de l'infection par le virus [204, 260, 285]. En l'absence de Tat, le VIH est incapable d'assurer la synthèse de transcrits de taille complète et de produire des virions infectieux [204]. La protéine Tat peut également être sécrétée par les cellules infectées. Des études ont montré que Tat est présente dans le sérum d'individus infectés par le VIH à la concentration de l'ordre du nanomolaire, suffisante pour son implication dans la régulation de nombreux gènes cellulaires. Cependant, de façon inattendue, même si Tat joue un rôle essentiel dans la réplication et la pathogenèse du VIH-1, l'interaction de sa forme soluble avec les PRR, en particulier les PRR solubles, était encore inexplorée au commencement de ma thèse. Toutes ces observations nous ont donc conduit à nous intéresser aux interactions potentielles de la protéine Tat extracellulaire avec les PRR solubles. Nous avons ainsi initié l'étude de potentielles interactions des protéines du VIH-1 (gp120, Rev, p24 et Tat) avec les récepteurs solubles de l'immunité innée, et en particulier avec les PRR de la famille des pentraxines.

Nous avons montré que la protéine Tat du VIH-1 interagit sélectivement avec les PRR solubles appartenant à la famille des pentraxines, médiateurs clés du bras humoral de l'immunité innée et impliqués dans la capture et la destruction des microbes ou de composants microbiens [152, 413]. L'interaction de Tat avec SAP et CRP, mais pas avec PTX3, est dépendante du calcium. Cette caractéristique des pentraxines courtes a déjà été mise en évidence avec d'autres ligands dans des études antérieures [152, 413]. Les pentraxines sont fonctionnelles sous leur structure homopentamérique. En effet, l'interaction de Tat avec les pentraxines chimiquement réduites est très faible en comparaison des protéines natives. Nous avons également montré que Tat est capable de lier les pentraxines en solution, suggérant

fortement que des complexes Tat/Pentraxines pourraient être présents dans le sérum d'individus infectés par le VIH.

Tat possède six domaines fonctionnels, chacun jouant un rôle dans ses différentes activités. L'utilisation de peptides chevauchants couvrant toute la séquence de Tat nous a permis de montrer que les sites de liaison aux pentraxines sont principalement les domaines riche en cystéines et basique. De plus, l'héparine, un ligand de Tat se fixant sur le domaine basique, inhibe l'interaction de Tat avec les pentraxines ; confirmant ainsi l'implication du domaine basique de Tat dans son interaction avec les pentraxines. Ces deux domaines sont indispensables dans l'internalisation de Tat dans les cellules et pour son activité de transactivation et la régulation de nombreux gènes. Le domaine riche en cystéine contient sept cystéines parmi lesquelles six sont hautement conservées. Il a été montré que la mutation d'une de ces cystéines abolit totalement la transcription du VIH induite par Tat. Ce type de mutation empêche le recrutement par Tat des cofacteurs cellulaires nécessaires à la phosphorylation de l'ARN polymérase II pour une synthèse efficace et complète du génome viral. De plus, les mutations dans le domaine basique empêchent la fixation de Tat à l'ARN viral. Ces données de la littérature sont cohérentes avec nos résultats montrant que les pentraxines sont incapables d'interagir avec la protéine Tat mutée sur ses domaines basique et riche en cystéine.

Nous avons montré que la phosphocholine, un ligand commun aux trois pentraxines inhibe l'interaction de Tat avec SAP, CRP et PTX3. Cette inhibition suggère fortement que le domaine des pentraxines impliqué dans la reconnaissance de Tat est la partie C-terminale.

Nous avons ensuite évalué l'impact des pentraxines sur la transcription in vitro du VIH induite par Tat. De façon surprenante, nous avons observé que CRP, mais pas SAP et PTX3, potentialise la transcription du VIH induite par Tat. Cette observation était étonnante du fait que les trois pentraxines lient Tat de la même façon et sur les mêmes domaines. Cette particularité de CRP nous a conduits à formuler l'hypothèse d'une différence d'influence des pentraxines dans la fixation et/ou l'entrée de Tat dans les cellules.

Nous avons ainsi évalué la capacité de Tat à fixer les cellules épithéliales, myéloïdes et lymphoïdes humaines en présence des pentraxines. Nous avons observé que les trois pentraxines n'altèrent pas la fixation de Tat aux cellules. Nous avons montré que, même en présence d'un excès de pentraxine, la fixation cellulaire des complexes Tat/pentraxines n'est pas altérée. Une étude a récemment mis en évidence que les récepteurs de la partie Fc des immunoglobulines (ou FcγR) sont des structures se liant aux pentraxines [414]. Nous avons

montré que la fixation et/ou l'entrée des complexes Tat/pentraxines ne sont pas médiées via les Fc γ R. Ces observations suggèrent que l'internalisation des complexes formés par la molécule Tat et les pentraxines ne serait pas médiée via les structures membranaires de reconnaissance de SAP, CRP ou PTX3. L'entrée de ces complexes dans les cellules serait donc déterminée par la protéine virale Tat.

Ces deux hypothèses n'ont pas permis de discriminer des fonctions particulières de CRP versus SAP/PTX3. La protéine Tat étant dégradée au cours de son internalisation dans les endosomes acides, nous avons alors formulé l'hypothèse selon laquelle CRP protégerait Tat au cours de ce processus. Nous avons montré que les trois pentraxines protègent la protéine Tat et que la partie N-ter de Tat est protégée de manière privilégiée par les pentraxines.

Finalement, l'évaluation de la localisation cellulaire nous a permis de montrer que, parmi les trois pentraxines, seule CRP, en plus de protéger Tat de la protéolyse, favorise son accumulation nucléaire.

L'ensemble de ces données suggère que la potentialisation de l'activité de transactivation de Tat résulterait principalement d'une accumulation nucléaire.

Après exposition de l'organisme à des pathogènes ou des médiateurs pro-inflammatoires, les hépatocytes produisent et libèrent SAP et CRP en réponse principalement à l'IL-6 produite par les cellules de l'immunité innée. SAP et CRP, au cours de la phase aigüe de l'inflammation, atteignent des concentrations plasmatiques très élevées (de 1000 à 10000 fois plus importantes pour CRP). Les pentraxines sont en effet des protéines qui sont rapidement libérées au cours du processus inflammatoire. Si les pentraxines n'interagissent pas avec les protéines d'enveloppe du VIH, leur liaison avec la protéine Tat soulève un certain nombre d'interrogations. Car, si dans nos travaux, les complexes formés par Tat et SAP/PTX3 ne montrent aucune influence sur l'activité principale de Tat qui est de potentialiser la transcription du VIH, il serait judicieux de prendre en considération ces interactions dans les nombreux autres effets de la protéine Tat extracellulaire.

Cependant, seule la protéine de la phase aigüe de l'inflammation CRP potentialise la transcription du VIH induite par la protéine Tat. Malgré le fait que seule CRP augmente la transcription du VIH induite par Tat suite à l'accumulation nucléaire du facteur de transcription viral, ces données suggèrent que l'interaction de Tat avec CRP permet la stabilisation du complexe et ne cacherait pas les résidus nécessaires au recrutement des cofacteurs CDK9 et la cycline T1 par Tat, ou son interaction avec l'élément TAR de l'ARN viral, pour son activité de transactivation. Toutefois, si des travaux ont montré que Tat peut

être utilisée comme une protéine cargo avec des effets physiologiques avérés des molécules transportées, à l'inverse, peu d'études ont été réalisées pour évaluer le rôle du facteur de transcription viral une fois complexé.

De nombreuses études montrent une corrélation entre les niveaux sériques de CRP et la progression de la maladie chez les personnes infectées par le VIH. En effet, chez ces individus, des niveaux élevés de CRP sont associés à une mauvaise réponse à la thérapie antivirale [415], une progression rapide de la maladie vers le stade SIDA [416, 417] et une mortalité plus élevée [418-420]. Les résultats de notre étude suggèreraient que la formation des complexes entre Tat et les pentraxines dans le milieu extracellulaire, et plus particulièrement avec CRP, augmenterait son activité de transactivation. Cette hypothèse est cohérente avec les résultats que nous avons obtenus avec la technique DLS permettant d'évaluer l'interaction en solution. En effet, nous avons observé que la protéine Tat est capable de lier les pentraxines SAP, CRP et PTX3 en solution. Ce résultat nous permet de suggérer la présence des complexes Tat/pentraxine dans le sérum d'individus infectés par le VIH. Ainsi, le mauvais pronostic corrélé aux niveaux sériques de CRP s'expliquerait en partie par le détournement de CRP par Tat pour maintenir un niveau élevé de réplication virale, malgré la thérapie antivirale. L'interaction entre Tat et les pentraxines, et plus particulièrement avec CRP, ouvrirait ainsi de nouvelles perspectives visant à évaluer le rôle des complexes formés lors du développement des maladies opportunistes liées à l'infection à VIH au cours de la phase SIDA.

D'autre part, malgré de nombreuses études montrant que la protéine Tat est peu immunogène au regard des résultats de son utilisation comme cible vaccinale, la protéine régulatrice de la transcription virale demeure un facteur important dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques mis en jeu par le VIH pour échapper et détourner le système immunitaire.

Dans un second temps, nous avons initié l'étude de l'impact des complexes Tat/pentraxines, et plus particulièrement Tat/CRP, sur la différenciation des monocytes en cellules dendritiques.

Bien que cette étude en soit à un stade très préliminaire, les premiers résultats montrent que la protéine Tat pourrait avoir un rôle au cours de la différenciation des DC chez les personnes infectées par le VIH. Les cellules différenciées en présence de Tat montrent une faible acquisition du récepteur CD1a, spécifique des DC immatures, et un maintien assez important du récepteur CD14. Ce résultat suggérerait que Tat empêche la différenciation des monocytes

en DC. Toutefois, l'évaluation de certains marqueurs membranaires par les cellules générées en présence ou non de Tat, activées avec le LPS, ne montrent pas des différences significatives ; même si les cellules différenciées en présence de Tat expriment un peu plus le CD86 et moins de CD40.

Le profil cytokinique nous a permis d'observer qu'en présence de Tat, les cellules produisent moins d'IL10 lorsqu'elles sont activées avec le LPS. Cette production d'IL-10 est restaurée lorsque les cellules ont été différenciées en présence du complexe Tat/CRP. En revanche, la production d'IL-12 est significativement diminuée pour des cellules générées en présence de Tat. Cette production est totalement inhibée lorsque les cellules ont été différenciées en présence du complexe Tat/CRP. Ce profil des cellules générées en présence de Tat, mieux encore en présence du complexe Tat/CRP, suggère l'orientation de celles-ci vers un phénotype de type tolérogène ou immunosuppresseur.

En parallèle de l'étude sur l'interaction de la molécule Tat avec les pentraxines humaines ainsi que leurs conséquences sur la transcription du VIH induite par Tat et sur la différenciation de monocytes en DC, j'ai initié l'analyse de la régulation de l'expression du RFcγIII (CD16) par les monocytes, macrophages et DC humains. Cette étude a permis de montrer que, parmi toutes les cytokines testées, seules les molécules pro-inflammatoires IL-1β, IL-6 et IL-21 et la molécule anti-inflammatoire IL-10 augmentent l'expression de CD16 sur les monocytes/macrophages et induisent son expression sur les DC. Afin de déterminer si l'absence de CD16 sur les DC immatures était corrélée au niveau de son ARNm, nous avons évalué sa synthèse par RT-PCR. Nous avons observé que les DC générées à partir de monocytes ne synthétisent pas de façon constitutive le CD16, mais que sa synthèse est induite lorsque les cellules sont stimulées avec les cytokines IL-1β, IL-6, IL-21 et IL-10. Si les DC n'expriment pas CD16 constitutivement, une étude assez récente a mis en évidence des DC myéloïdes circulantes exprimant le CD16 et présentant une spécialisation fonctionnelle et une forte activité pro-inflammatoire [421]. De plus, des études ont montré que les monocytes CD14⁺CD16⁺, fréquemment impliqués au cours de processus inflammatoires ou lors de certaines infections, se différencient préférentiellement en DC [408]. Nous avons également observé que IL-1β, IL-6, IL-21 et IL-10 induisent l'acquisition de CD16 par la sous-population de monocytes CD14⁺CD16⁻. L'expression de CD16 sur les monocytes totaux est en moyenne deux fois plus élevée que pour la sous-population de monocytes CD14⁺CD16⁻, suggérant un rôle de ces cytokines dans l'augmentation du nombre des monocytes CD14⁺CD16⁺ au cours de certaines pathologies comme l'infection à VIH-1 [422] ou

l'arthrite rhumatoïde [423]. Des travaux ont rapporté l'implication du récepteur CD16 dans la reconnaissance des complexes immuns et la présentation antigénique par les cellules effectrices [424].

Afin de déterminer si les DC générées à partir des monocytes totaux ou la sous-population de monocytes CD14⁺CD16⁻ présentent des différences phénotypiques, nous les avons activées avec le LPS et analysé l'expression des marqueurs membranaires et la production de cytokines. Aucune différence significative n'a été observée dans l'expression des marqueurs de surface évalués (CD40, CD80, CD83 et CD86) après activation avec le LPS. Cependant, les DC générées à partir des monocytes totaux produisent presque 2 fois plus d'IL-10 et d'IL-12 que celles dérivées des monocytes CD14⁺CD16⁻. Le même résultat a été obtenu avec les macrophages générés à partir des mêmes cellules.

L'ensemble de résultats de cette étude a permis de mettre en évidence l'augmentation de CD16 sur les monocytes/macrophages et son induction sur les DC stimulés avec les cytokines IL-1 β , IL-6, IL-10 et IL-21. Ces quatre cytokines permettent également l'acquisition de CD16 par la sous-population de monocytes CD14⁺CD16⁻. Ces résultats suggéreraient ainsi un rôle de ces cytokines dans la modulation du nombre de monocytes CD14⁺CD16⁺ au cours de processus inflammatoires ou pendant certaines infections.

En conclusion, l'ensemble de mes travaux de thèse a principalement permis de montrer une interaction sélective de la protéine virale Tat avec les récepteurs solubles de l'immunité innée SAP, CRP et PTX3. L'interaction avec CRP augmente l'activité transcriptionnelle de Tat en la protégeant de la protéolyse et en favorisant son accumulation nucléaire. Ces données illustrent un nouveau moyen pour le VIH d'échapper au système immunitaire. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans la recherche de la compréhension des mécanismes mis en jeu par le VIH pour résister et échapper à la pression immunitaire.

Il serait ainsi intéressant d'évaluer le mécanisme moléculaire impliqué dans l'accumulation nucléaire de Tat une fois complexée à CRP et de rechercher la présence des complexes Tat/pentraxines, et plus particulièrement Tat/CRP, chez les personnes infectées par le VIH afin d'établir une corrélation avec les infections opportunistes, et donc la progression de la maladie. Il serait également intéressant d'évaluer les conséquences de l'interaction de Tat avec les pentraxines sur l'initiation des réponses immunitaires humorale et cellulaire, spécifiques de Tat

Ces travaux ont également permis d'ouvrir de nouvelles perspectives sur le rôle potentiel de Tat et des complexes Tat/pentraxines sur la différenciation des monocytes en cellules dendritiques. En effet, les résultats préliminaires suggèrent que Tat pourrait affecter de manière significative la différenciation des monocytes en DC en favorisant la génération de cellules présentant des propriétés immunosuppressives. Il serait donc intéressant de compléter l'étude du rôle de Tat ou des complexes Tat/pentraxines sur la polarisation des DC générées et les conséquences sur la polarisation des lymphocytes T naïfs en utilisant un modèle spécifique d'antigènes tel que le modèle NS3 disponible au laboratoire.

Enfin, ces travaux ont aussi permis de mettre en évidence l'augmentation et l'acquisition de l'expression de CD16 par les monocytes/macrophages et DC humains stimulés avec les cytokines IL-1 β , IL-6, IL-10 et IL-21. Ces données suggèrent une voie qui permettrait d'expliquer, du moins en partie, l'augmentation du nombre de monocytes CD14+CD16+ impliquées dans la plupart des processus inflammatoires et au cours de certaines pathologies. Il serait intéressant d'investiguer la corrélation entre les niveaux de ces quatre cytokines et le nombre de monocytes CD14+CD16+ dans le cadre de certaines pathologies ou au cours des processus inflammatoires pendant lesquels des niveaux élevés d'IL-1 β et d'IL-6 sont produits par les cellules du système immunitaire. Il conviendrait également d'analyser le rôle potentiel de ces quatre cytokines dans le développement des DC circulantes exprimant spécifiquement le récepteur CD16. Enfin il serait intéressant d'évaluer l'efficacité de la reconnaissance des complexes immuns et la capacité de présentation antigénique par les cellules effectrices préalablement sensibilisées avec les cytokines IL-1 β , IL-6, IL-10 et IL-21.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
2. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
3. Harding, F.A., et al., *CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones*. Nature, 1992. **356**(6370): p. 607-9.
4. Moretta, L., et al., *Different checkpoints in human NK-cell activation*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 670-6.
5. Delneste, Y., C. Beauvillain, and P. Jeannin, *[Innate immunity: structure and function of TLRs]*. Med Sci (Paris), 2007. **23**(1): p. 67-73.
6. Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann, *Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 669-92.
7. Swirski, F.K., R. Weissleder, and M.J. Pittet, *Heterogeneous in vivo behavior of monocyte subsets in atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(10): p. 1424-32.
8. Serbina, N.V., et al., *Selective expansion of the monocytic lineage directed by bacterial infection*. J Immunol, 2009. **183**(3): p. 1900-10.
9. Passlick, B., D. Flieger, and H.W. Ziegler-Heitbrock, *Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood*. Blood, 1989. **74**(7): p. 2527-34.
10. Ziegler-Heitbrock, H.W., et al., *The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages*. Eur J Immunol, 1993. **23**(9): p. 2053-8.
11. Weber, C., et al., *Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(5): p. 699-704.
12. Randolph, G.J., et al., *Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking*. Science, 1998. **282**(5388): p. 480-3.
13. Randolph, G.J., et al., *The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting*. J Exp Med, 2002. **196**(4): p. 517-27.
14. Ahuja, V., S.E. Miller, and D.N. Howell, *Identification of two subpopulations of rat monocytes expressing disparate molecular forms and quantities of CD43*. Cell Immunol, 1995. **163**(1): p. 59-69.
15. Sunderkotter, C., et al., *Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4410-7.
16. Chamorro, S., et al., *Phenotypic characterization of monocyte subpopulations in the pig*. Immunobiology, 2000. **202**(1): p. 82-93.
17. Chamorro, S., et al., *Phenotypic and functional heterogeneity of porcine blood monocytes and its relation with maturation*. Immunology, 2005. **114**(1): p. 63-71.
18. Kuziel, W.A., et al., *Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(22): p. 12053-8.
19. Lu, B., et al., *Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice*. J Exp Med, 1998. **187**(4): p. 601-8.

20. Gu, L., et al., *Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice*. Mol Cell, 1998. **2**(2): p. 275-81.
21. Serbina, N.V. and E.G. Pamer, *Immunology. Giving credit where credit is due*. Science, 2003. **301**(5641): p. 1856-7.
22. Kurihara, T., et al., *Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor*. J Exp Med, 1997. **186**(10): p. 1757-62.
23. Gordon, S., et al., *Localization and function of tissue macrophages*. Ciba Found Symp, 1986. **118**: p. 54-67.
24. Gordon, S., *The role of the macrophage in immune regulation*. Res Immunol, 1998. **149**(7-8): p. 685-8.
25. Austyn, J.M. and S. Gordon, *F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage*. Eur J Immunol, 1981. **11**(10): p. 805-15.
26. Dijkstra, C.D., et al., *The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3*. Immunology, 1985. **54**(3): p. 589-99.
27. Kraal, G. and M. Janse, *Marginal metallophilic cells of the mouse spleen identified by a monoclonal antibody*. Immunology, 1986. **58**(4): p. 665-9.
28. McCusker, K. and J. Hoidal, *Characterization of scavenger receptor activity in resident human lung macrophages*. Exp Lung Res, 1989. **15**(4): p. 651-61.
29. Palecanda, A., et al., *Role of the scavenger receptor MARCO in alveolar macrophage binding of unopsonized environmental particles*. J Exp Med, 1999. **189**(9): p. 1497-506.
30. Taylor, M.J., *A new insight into the pathogenesis of filarial disease*. Curr Mol Med, 2002. **2**(3): p. 299-302.
31. Surh, C.D. and J. Sprent, *T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus*. Nature, 1994. **372**(6501): p. 100-3.
32. Tabe, H., et al., *Cell dynamics in the germinal center of the human tonsil*. Acta Otolaryngol Suppl, 1996. **523**: p. 64-7.
33. Lin, D.J., et al., *[Antigen-loaded dendritic cells trigger killing effects of specific cytotoxic T lymphocytes on Jurkat cells in vitro]*. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2006. **14**(4): p. 795-9.
34. Cella, M., et al., *Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA*. J Exp Med, 1999. **189**(5): p. 821-9.
35. Siegal, F.P., et al., *The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood*. Science, 1999. **284**(5421): p. 1835-7.
36. Asselin-Paturel, C., et al., *Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration*. J Exp Med, 2005. **201**(7): p. 1157-67.
37. Randolph, G.J., et al., *Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo*. Immunity, 1999. **11**(6): p. 753-61.
38. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
39. Mellman, I. and R.M. Steinman, *Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines*. Cell, 2001. **106**(3): p. 255-8.
40. Liu, K., et al., *In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis*. Science, 2009. **324**(5925): p. 392-7.
41. Waskow, C., et al., *The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues*. Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 676-83.
42. Merad, M., et al., *Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions*. Nat Immunol, 2002. **3**(12): p. 1135-41.

43. Corcoran, L., et al., *The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells*. J Immunol, 2003. **170**(10): p. 4926-32.
44. Colonna, M., G. Trinchieri, and Y.J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells in immunity*. Nat Immunol, 2004. **5**(12): p. 1219-26.
45. Rossi, M. and J.W. Young, *Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity*. J Immunol, 2005. **175**(3): p. 1373-81.
46. Sozzani, S., et al., *Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines*. J Immunol, 1997. **159**(4): p. 1993-2000.
47. Gough, P.J. and S. Gordon, *The role of scavenger receptors in the innate immune system*. Microbes Infect, 2000. **2**(3): p. 305-11.
48. Bonifaz, L., et al., *Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance*. J Exp Med, 2002. **196**(12): p. 1627-38.
49. Martinon, F., A. Mayor, and J. Tschopp, *The inflammasomes: guardians of the body*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 229-65.
50. Mukhopadhyay, S. and S. Gordon, *The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity*. Immunobiology, 2004. **209**(1-2): p. 39-49.
51. Geijtenbeek, T.B., et al., *DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells*. Cell, 2000. **100**(5): p. 587-97.
52. Thomas, C.A., et al., *Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis*. J Exp Med, 2000. **191**(1): p. 147-56.
53. Pluddemann, A., C. Neyer, and S. Gordon, *Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands*. Methods, 2007. **43**(3): p. 207-17.
54. Pepys, M.B., et al., *Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease*. Nature, 2006. **440**(7088): p. 1217-21.
55. Soilleux, E.J., et al., *Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(3): p. 445-57.
56. McGreal, E.P., J.L. Miller, and S. Gordon, *Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(1): p. 18-24.
57. Appelmelk, B.J., et al., *Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells*. J Immunol, 2003. **170**(4): p. 1635-9.
58. Bernhard, O.K., et al., *Proteomic analysis of DC-SIGN on dendritic cells detects tetramers required for ligand binding but no association with CD4*. J Biol Chem, 2004. **279**(50): p. 51828-35.
59. Moris, A., et al., *DC-SIGN promotes exogenous MHC-I-restricted HIV-1 antigen presentation*. Blood, 2004. **103**(7): p. 2648-54.
60. Hodges, A., et al., *Activation of the lectin DC-SIGN induces an immature dendritic cell phenotype triggering Rho-GTPase activity required for HIV-1 replication*. Nat Immunol, 2007. **8**(6): p. 569-77.
61. Geijtenbeek, T.B., et al., *Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function*. J Exp Med, 2003. **197**(1): p. 7-17.
62. Brennan, K. and A.G. Bowie, *Activation of host pattern recognition receptors by viruses*. Curr Opin Microbiol. **13**(4): p. 503-7.
63. Wickelgren, I., *Immunology. Targeting the tolls*. Science, 2006. **312**(5771): p. 184-7.
64. Wickelgren, I., *Immunology. Mouse studies question importance of toll-like receptors to vaccines*. Science, 2006. **314**(5807): p. 1859-60.

65. Uematsu, S. and S. Akira, *Toll-like receptors and innate immunity*. J Mol Med, 2006. **84**(9): p. 712-25.
66. Schlaepfer, E., et al., *TLR7/8 triggering exerts opposing effects in acute versus latent HIV infection*. J Immunol, 2006. **176**(5): p. 2888-95.
67. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
68. Hashimoto, C., K.L. Hudson, and K.V. Anderson, *The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein*. Cell, 1988. **52**(2): p. 269-79.
69. Ishii, K.J., et al., *A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA*. Nat Immunol, 2006. **7**(1): p. 40-8.
70. Chalifour, A., et al., *Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production*. Blood, 2004. **104**(6): p. 1778-83.
71. Nagase, H., et al., *Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand*. J Immunol, 2003. **171**(8): p. 3977-82.
72. Komiya, A., et al., *Expression and function of toll-like receptors in human basophils*. Int Arch Allergy Immunol, 2006. **140 Suppl 1**: p. 23-7.
73. Sabroe, I., et al., *Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses*. J Immunol, 2002. **168**(9): p. 4701-10.
74. Iida, M., et al., *Lipopolysaccharide primes human basophils for enhanced mediator release: requirement for plasma co-factor and CD14*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **203**(2): p. 1295-301.
75. Clementsen, P., et al., *Bacteria and endotoxin enhance basophil histamine release and potentiation is abolished by carbohydrates*. Allergy, 1990. **45**(6): p. 402-8.
76. Caron, G., et al., *Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells*. J Immunol, 2005. **175**(3): p. 1551-7.
77. Pasare, C. and R. Medzhitov, *Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity*. Adv Exp Med Biol, 2005. **560**: p. 11-8.
78. Musette, P., I. Auquit Auckbur, and E. Begon, *[Cutaneous expression and function of Toll-like receptors]*. Ann Dermatol Venereol, 2006. **133**(3): p. 268-71.
79. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
80. Beutler, B., *Toll-like receptors and their place in immunology. Where does the immune response to infection begin?* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 498.
81. Haig, D.M., J. Hopkins, and H.R. Miller, *Local immune responses in afferent and efferent lymph*. Immunology, 1999. **96**(2): p. 155-63.
82. Rescigno, M., et al., *Coordinated events during bacteria-induced DC maturation*. Immunol Today, 1999. **20**(5): p. 200-3.
83. Sallusto, F., et al., *Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function*. Eur J Immunol, 1999. **29**(5): p. 1617-25.
84. Rescigno, M., F. Granucci, and P. Ricciardi-Castagnoli, *Molecular events of bacterial-induced maturation of dendritic cells*. J Clin Immunol, 2000. **20**(3): p. 161-6.
85. Albiger, B., et al., *Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors*. J Intern Med, 2007. **261**(6): p. 511-28.
86. Meylan, E., J. Tschopp, and M. Karin, *Intracellular pattern recognition receptors in the host response*. Nature, 2006. **442**(7098): p. 39-44.

87. Royet, J. and J.M. Reichhart, *Detection of peptidoglycans by NOD proteins*. Trends Cell Biol, 2003. **13**(12): p. 610-4.
88. Uehara, A., et al., *Muramyl dipeptide and diaminopimelic acid-containing desmuramyl peptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture*. Cell Microbiol, 2005. **7**(1): p. 53-61.
89. Chamaillard, M., et al., *An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid*. Nat Immunol, 2003. **4**(7): p. 702-7.
90. Kufer, T.A. and P.J. Sansonetti, *Sensing of bacteria: NOD a lonely job*. Curr Opin Microbiol, 2007. **10**(1): p. 62-9.
91. Kobayashi, K.S., et al., *Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract*. Science, 2005. **307**(5710): p. 731-4.
92. Fritz, J.H., et al., *Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity*. Immunity, 2007. **26**(4): p. 445-59.
93. Sutterwala, F.S., et al., *Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1*. Immunity, 2006. **24**(3): p. 317-27.
94. Watanabe, H., et al., *Danger signaling through the inflammasome acts as a master switch between tolerance and sensitization*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 5826-32.
95. Fernandes-Alnemri, T., et al., *The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation*. Cell Death Differ, 2007. **14**(9): p. 1590-604.
96. Fink, S.L. and B.T. Cookson, *Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages*. Cell Microbiol, 2006. **8**(11): p. 1812-25.
97. Willingham, S.B., et al., *Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(3): p. 147-59.
98. Lopez, C.B., et al., *TLR-independent induction of dendritic cell maturation and adaptive immunity by negative-strand RNA viruses*. J Immunol, 2004. **173**(11): p. 6882-9.
99. Kato, H., et al., *Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response*. Immunity, 2005. **23**(1): p. 19-28.
100. Hornung, V., et al., *5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I*. Science, 2006. **314**(5801): p. 994-7.
101. Kawai, T. and S. Akira, *Antiviral signaling through pattern recognition receptors*. J Biochem, 2007. **141**(2): p. 137-45.
102. Stettner, M.R., et al., *SMAD proteins of oligodendroglial cells regulate transcription of JC virus early and late genes coordinately with the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 8): p. 2005-14.
103. Garlanda, C., et al., *Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 337-66.
104. Gupta, G. and A. Surolia, *Collectins: sentinels of innate immunity*. Bioessays, 2007. **29**(5): p. 452-64.
105. Ohtani, K., et al., *The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(47): p. 44222-8.
106. Endo, Y., M. Matsushita, and T. Fujita, *Role of ficolin in innate immunity and its molecular basis*. Immunobiology, 2007. **212**(4-5): p. 371-9.

107. Liu, Y., et al., *Ficolin A and ficolin B are expressed in distinct ontogenic patterns and cell types in the mouse*. Mol Immunol, 2005. **42**(11): p. 1265-73.
108. Lu, J., et al., *Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1572**(2-3): p. 387-400.
109. Holmskov, U., S. Thiel, and J.C. Jensenius, *Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 547-78.
110. Honore, C., et al., *The innate immune component ficolin 3 (Hakata antigen) mediates the clearance of late apoptotic cells*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(5): p. 1598-607.
111. Jensen, M.L., et al., *Ficolin-2 recognizes DNA and participates in the clearance of dying host cells*. Mol Immunol, 2007. **44**(5): p. 856-65.
112. Weikert, L.F., et al., *SP-A enhances uptake of bacillus Calmette-Guerin by macrophages through a specific SP-A receptor*. Am J Physiol, 1997. **272**(5 Pt 1): p. L989-95.
113. Ghiran, I., et al., *Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin*. J Exp Med, 2000. **192**(12): p. 1797-808.
114. Shi, L., et al., *Mannose-binding lectin-deficient mice are susceptible to infection with Staphylococcus aureus*. J Exp Med, 2004. **199**(10): p. 1379-90.
115. Moller-Kristensen, M., et al., *Levels of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 in healthy individuals*. J Immunol Methods, 2003. **282**(1-2): p. 159-67.
116. Ma, Y.G., et al., *Human mannan-binding lectin and L-ficolin function as specific pattern recognition proteins in the lectin activation pathway of complement*. J Biol Chem, 2004. **279**(24): p. 25307-12.
117. Thiel, S., *Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins*. Mol Immunol, 2007. **44**(16): p. 3875-88.
118. Nauta, A.J., et al., *Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins*. Trends Immunol, 2003. **24**(3): p. 148-54.
119. Stuart, L.M., et al., *Mannose-binding lectin-deficient mice display defective apoptotic cell clearance but no autoimmune phenotype*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3220-6.
120. Gardai, S.J., et al., *By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation*. Cell, 2003. **115**(1): p. 13-23.
121. Bottazzi, B., et al., *The long pentraxin PTX3 as a link among innate immunity, inflammation, and female fertility*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(5): p. 909-12.
122. Martinez de la Torre, Y., et al., *Evolution of the pentraxin family: the new entry PTX4*. J Immunol. **184**(9): p. 5055-64.
123. Mantovani, A., et al., *Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3*. J Clin Immunol, 2008. **28**(1): p. 1-13.
124. Shrive, A.K., et al., *Structure solution of C-reactive proteins: molecular replacement with a twist*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1996. **52**(Pt 6): p. 1049-57.
125. Bottazzi, B., et al., *Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component*. J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 32817-23.
126. Jensen, L.E., et al., *Acute phase proteins in salmonids: evolutionary analyses and acute phase response*. J Immunol, 1997. **158**(1): p. 384-92.
127. Hirschfield, G.M. and M.B. Pepys, *C-reactive protein and cardiovascular disease: new insights from an old molecule*. Qjm, 2003. **96**(11): p. 793-807.
128. Zhang, D., et al., *The effect of interleukin-1 on C-reactive protein expression in Hep3B cells is exerted at the transcriptional level*. Biochem J, 1995. **310** (Pt 1): p. 143-8.

129. Mortensen, R.F., et al., *Acute-phase reactants of mice. II. Strain dependence of serum amyloid P-component (SAP) levels and response to inflammation.* J Immunol, 1983. **130**(2): p. 885-9.
130. Hutchinson, W.L., E. Hohenester, and M.B. Pepys, *Human serum amyloid P component is a single uncomplexed pentamer in whole serum.* Mol Med, 2000. **6**(6): p. 482-93.
131. Szalai, A.J., *The biological functions of C-reactive protein.* Vascul Pharmacol, 2002. **39**(3): p. 105-7.
132. Gershov, D., et al., *C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity.* J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1353-64.
133. Hicks, P.S., et al., *Serum amyloid P component binds to histones and activates the classical complement pathway.* J Immunol, 1992. **149**(11): p. 3689-94.
134. Hind, C.R., et al., *Human serum amyloid P component, a circulating lectin with specificity for the cyclic 4,6-pyruvate acetal of galactose. Interactions with various bacteria.* Biochem J, 1985. **225**(1): p. 107-11.
135. Andersen, O., et al., *Serum amyloid P component binds to influenza A virus haemagglutinin and inhibits the virus infection in vitro.* Scand J Immunol, 1997. **46**(4): p. 331-7.
136. de Haas, C.J., et al., *A synthetic lipopolysaccharide-binding peptide based on amino acids 27-39 of serum amyloid P component inhibits lipopolysaccharide-induced responses in human blood.* J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3607-15.
137. Noursadeghi, M., et al., *Role of serum amyloid P component in bacterial infection: protection of the host or protection of the pathogen.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14584-9.
138. Bijl, M., et al., *Serum amyloid P component binds to late apoptotic cells and mediates their uptake by monocyte-derived macrophages.* Arthritis Rheum, 2003. **48**(1): p. 248-54.
139. Yother, J., J.E. Volanakis, and D.E. Briles, *Human C-reactive protein is protective against fatal Streptococcus pneumoniae infection in mice.* J Immunol, 1982. **128**(5): p. 2374-6.
140. Szalai, A.J., D.E. Briles, and J.E. Volanakis, *Human C-reactive protein is protective against fatal Streptococcus pneumoniae infection in transgenic mice.* J Immunol, 1995. **155**(5): p. 2557-63.
141. Szalai, A.J., et al., *Human C-reactive protein is protective against fatal Salmonella enterica serovar typhimurium infection in transgenic mice.* Infect Immun, 2000. **68**(10): p. 5652-6.
142. Mold, C. and T.W. Du Clos, *C-reactive protein increases cytokine responses to Streptococcus pneumoniae through interactions with Fc gamma receptors.* J Immunol, 2006. **176**(12): p. 7598-604.
143. Ng, P.M., et al., *C-reactive protein collaborates with plasma lectins to boost immune response against bacteria.* Embo J, 2007. **26**(14): p. 3431-40.
144. Suresh, M.V., et al., *Human C-reactive protein protects mice from Streptococcus pneumoniae infection without binding to pneumococcal C-polysaccharide.* J Immunol, 2007. **178**(2): p. 1158-63.
145. Agrawal, A., et al., *A C-reactive protein mutant that does not bind to phosphocholine and pneumococcal C-polysaccharide.* J Immunol, 2002. **169**(6): p. 3217-22.

146. Weiser, J.N., et al., *Phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of Haemophilus influenzae contributes to persistence in the respiratory tract and sensitivity to serum killing mediated by C-reactive protein*. J Exp Med, 1998. **187**(4): p. 631-40.
147. Xia, D. and D. Samols, *Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein are resistant to endotoxemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2575-80.
148. Mold, C., et al., *C-reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with Fc gamma R*. J Immunol, 2002. **169**(12): p. 7019-25.
149. Mold, C., R. Baca, and T.W. Du Clos, *Serum amyloid P component and C-reactive protein opsonize apoptotic cells for phagocytosis through Fc gamma receptors*. J Autoimmun, 2002. **19**(3): p. 147-54.
150. Hirschfield, G.M., et al., *Human C-reactive protein does not protect against acute lipopolysaccharide challenge in mice*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6046-51.
151. Armstrong, G.D., et al., *Human serum amyloid P component protects against Escherichia coli O157:H7 Shiga toxin 2 in vivo: therapeutic implications for hemolytic-uremic syndrome*. J Infect Dis, 2006. **193**(8): p. 1120-4.
152. Bottazzi, B., et al., *An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm*. Annu Rev Immunol. **28**: p. 157-83.
153. Muller, B., et al., *Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients*. Crit Care Med, 2001. **29**(7): p. 1404-7.
154. Peri, G., et al., *PTX3, A prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans*. Circulation, 2000. **102**(6): p. 636-41.
155. Breviario, F., et al., *Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component*. J Biol Chem, 1992. **267**(31): p. 22190-7.
156. Lee, G.W., T.H. Lee, and J. Vilcek, *TSG-14, a tumor necrosis factor- and IL-1-inducible protein, is a novel member of the pentaxin family of acute phase proteins*. J Immunol, 1993. **150**(5): p. 1804-12.
157. Garlanda, C., et al., *Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response*. Nature, 2002. **420**(6912): p. 182-6.
158. Nauta, A.J., et al., *Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells*. Eur J Immunol, 2003. **33**(10): p. 2853-63.
159. Kishore, U. and K.B. Reid, *Clq: structure, function, and receptors*. Immunopharmacology, 2000. **49**(1-2): p. 159-70.
160. Nauta, A.J., et al., *Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and Clq*. Eur J Immunol, 2003. **33**(2): p. 465-73.
161. Inforzato, A., et al., *Structure and function of the long pentraxin PTX3 glycosidic moiety: fine-tuning of the interaction with Clq and complement activation*. Biochemistry, 2006. **45**(38): p. 11540-51.
162. Rovere, P., et al., *The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4300-6.
163. van Rossum, A.P., et al., *The prototypic tissue pentraxin PTX3, in contrast to the short pentraxin serum amyloid P, inhibits phagocytosis of late apoptotic neutrophils by macrophages*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(8): p. 2667-74.
164. Garlanda, C., et al., *Characterization of MEC 14.7, a new monoclonal antibody recognizing mouse CD34: a useful reagent for identifying and characterizing blood vessels and hematopoietic precursors*. Eur J Cell Biol, 1997. **73**(4): p. 368-77.
165. Garlanda, C. and E. Dejana, *Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(7): p. 1193-202.
166. Sagar, M., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 V1-V2 envelope loop sequences expand and add glycosylation sites over the course of infection, and these*

- modifications affect antibody neutralization sensitivity.* J Virol, 2006. **80**(19): p. 9586-98.
167. Frost, S.D., et al., *Neutralizing antibody responses drive the evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope during recent HIV infection.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(51): p. 18514-9.
 168. Anglaret, X. and R. Salamon, *[The HIV/AIDS epidemic in sub-Saharan Africa]*. Med Sci (Paris), 2004. **20**(5): p. 593-8.
 169. Keele, B.F., et al., *Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1.* Science, 2006. **313**(5786): p. 523-6.
 170. Lemey, P., et al., *Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(11): p. 6588-92.
 171. Darlix, J.L. and Y. Levy, *[AIDS virus in the middle of the road twenty-five years later]*. Med Sci (Paris), 2008. **24**(1): p. 4-6.
 172. Van Heuverswyn, F., et al., *Genetic diversity and phylogeographic clustering of SIVcpzPtt in wild chimpanzees in Cameroon.* Virology, 2007. **368**(1): p. 155-71.
 173. Santiago, M.L., et al., *Noninvasive detection of Simian immunodeficiency virus infection in a wild-living L'Hoest's monkey (Cercopithecus lhoesti).* AIDS Res Hum Retroviruses, 2003. **19**(12): p. 1163-6.
 174. Santiago, M.L., et al., *Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (Cercopithecus atys atys) from the Tai Forest, Cote d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2.* J Virol, 2005. **79**(19): p. 12515-27.
 175. Santiago, M.L., et al., *SIVcpz in wild chimpanzees.* Science, 2002. **295**(5554): p. 465.
 176. Gao, F., et al., *Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes.* Nature, 1999. **397**(6718): p. 436-41.
 177. Stebbing, J., B. Gazzard, and D.C. Douek, *Where does HIV live?* N Engl J Med, 2004. **350**(18): p. 1872-80.
 178. Hahn, B.H., et al., *AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications.* Science, 2000. **287**(5453): p. 607-14.
 179. Weiss, R.A. and R.W. Wrangham, *From Pan to pandemic.* Nature, 1999. **397**(6718): p. 385-6.
 180. Hillis, D.M., *AIDS. Origins of HIV.* Science, 2000. **288**(5472): p. 1757-9.
 181. Korber, B., et al., *Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains.* Science, 2000. **288**(5472): p. 1789-96.
 182. Silvestri, G., et al., *Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia.* Immunity, 2003. **18**(3): p. 441-52.
 183. Quinn, T.C., *The epidemiology of the acquired immune deficiency syndrome and the immunological responses to the human immunodeficiency virus.* Curr Opin Immunol, 1989. **1**(3): p. 502-12.
 184. Cohen, J., *HIV transmission. Allegations raise fears of backlash against AIDS prevention strategy.* Science, 2004. **306**(5705): p. 2168-9.
 185. Galvin, S.R. and M.S. Cohen, *The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission.* Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(1): p. 33-42.
 186. Royce, R.A., et al., *Sexual transmission of HIV.* N Engl J Med, 1997. **336**(15): p. 1072-8.
 187. Vidal, N., et al., *Identification and molecular characterization of subsubtype A4 in central Africa.* AIDS Res Hum Retroviruses, 2006. **22**(2): p. 182-7.
 188. Geretti, A.M., *HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management.* Curr Opin Infect Dis, 2006. **19**(1): p. 1-7.

189. Chaix, M.L., et al., *Stable prevalence of genotypic drug resistance mutations but increase in non-B virus among patients with primary HIV-1 infection in France*. Aids, 2003. **17**(18): p. 2635-43.
190. Chaix, M.L., et al., *Low risk of nevirapine resistance mutations in the prevention of mother-to-child transmission of HIV-1: Agence Nationale de Recherches sur le SIDA Ditrane Plus, Abidjan, Cote d'Ivoire*. J Infect Dis, 2006. **193**(4): p. 482-7.
191. Descamps, D., et al., *Genotypic resistance analyses in nucleoside-pretreated patients failing an indinavir containing regimen: results from a randomized comparative trial: (Novavir ANRS 073)*. J Clin Virol, 2005. **33**(2): p. 99-103.
192. Semaille, C., et al., *Monitoring the dynamics of the HIV epidemic using assays for recent infection and serotyping among new HIV diagnoses: experience after 2 years in France*. J Infect Dis, 2007. **196**(3): p. 377-83.
193. Descamps, D., et al., *French national sentinel survey of antiretroviral drug resistance in patients with HIV-1 primary infection and in antiretroviral-naïve chronically infected patients in 2001-2002*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2005. **38**(5): p. 545-52.
194. Roquebert, B., et al., *HIV-2 integrase gene polymorphism and phenotypic susceptibility of HIV-2 clinical isolates to the integrase inhibitors raltegravir and elvitegravir in vitro*. J Antimicrob Chemother, 2008. **62**(5): p. 914-20.
195. Hill, P., *HIV drug mislabelled*. Aust Fam Physician, 1994. **23**(12): p. 2374.
196. Massiah, M.A., et al., *Three-dimensional structure of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein*. J Mol Biol, 1994. **244**(2): p. 198-223.
197. Cannon, P.M., et al., *Structure-function studies of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein, p17*. J Virol, 1997. **71**(5): p. 3474-83.
198. Ganser-Pornillos, B.K., A. Cheng, and M. Yeager, *Structure of full-length HIV-1 CA: a model for the mature capsid lattice*. Cell, 2007. **131**(1): p. 70-9.
199. Covey, S.N., *Amino acid sequence homology in gag region of reverse transcribing elements and the coat protein gene of cauliflower mosaic virus*. Nucleic Acids Res, 1986. **14**(2): p. 623-33.
200. Cimarrelli, A. and J. Luban, *Human immunodeficiency virus type 1 virion density is not determined by nucleocapsid basic residues*. J Virol, 2000. **74**(15): p. 6734-40.
201. Morellet, N., et al., *Determination of the structure of the nucleocapsid protein NCp7 from the human immunodeficiency virus type 1 by 1H NMR*. Embo J, 1992. **11**(8): p. 3059-65.
202. Gorelick, R.J., et al., *Noninfectious human immunodeficiency virus type 1 mutants deficient in genomic RNA*. J Virol, 1990. **64**(7): p. 3207-11.
203. Summers, M.F., et al., *Nucleocapsid zinc fingers detected in retroviruses: EXAFS studies of intact viruses and the solution-state structure of the nucleocapsid protein from HIV-1*. Protein Sci, 1992. **1**(5): p. 563-74.
204. Romani, B., S. Engelbrecht, and R.H. Glashoff, *Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1*. J Gen Virol. **91**(Pt 1): p. 1-12.
205. Baltimore, D., *RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses*. Nature, 1970. **226**(5252): p. 1209-11.
206. Tanese, N. and S.P. Goff, *Domain structure of the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase: mutational analysis and separate expression of the DNA polymerase and RNase H activities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(6): p. 1777-81.
207. Gopalakrishnan, V., J.A. Peliska, and S.J. Benkovic, *Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: spatial and temporal relationship between the polymerase and RNase H activities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): p. 10763-7.

208. Panganiban, A.T. and H.M. Temin, *The retrovirus pol gene encodes a product required for DNA integration: identification of a retrovirus int locus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(24): p. 7885-9.
209. Katoh, I., Y. Ikawa, and Y. Yoshinaka, *Retrovirus protease characterized as a dimeric aspartic proteinase*. J Virol, 1989. **63**(5): p. 2226-32.
210. Loeb, D.D., et al., *Complete mutagenesis of the HIV-1 protease*. Nature, 1989. **340**(6232): p. 397-400.
211. Bannwarth, S. and A. Gatignol, *HIV-1 TAR RNA: the target of molecular interactions between the virus and its host*. Curr HIV Res, 2005. **3**(1): p. 61-71.
212. Bayer, P., et al., *Structural studies of HIV-1 Tat protein*. J Mol Biol, 1995. **247**(4): p. 529-35.
213. Rubartelli, A., et al., *HIV-1 Tat: a polypeptide for all seasons*. Immunol Today, 1998. **19**(12): p. 543-5.
214. Bartel, D.P., et al., *HIV-1 Rev regulation involves recognition of non-Watson-Crick base pairs in viral RNA*. Cell, 1991. **67**(3): p. 529-36.
215. Malim, M.H., et al., *Mutational definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain*. J Virol, 1991. **65**(8): p. 4248-54.
216. Wu, Y. and J.W. Marsh, *Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA*. Science, 2001. **293**(5534): p. 1503-6.
217. Quaranta, M.G., et al., *The immunoregulatory effects of HIV-1 Nef on dendritic cells and the pathogenesis of AIDS*. Faseb J, 2006. **20**(13): p. 2198-208.
218. Quaranta, M.G., et al., *Immunoregulatory effects of HIV-1 Nef protein*. Biofactors, 2009. **35**(2): p. 169-74.
219. Ohagen, A. and D. Gabuzda, *Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core*. J Virol, 2000. **74**(23): p. 11055-66.
220. Bardy, M., et al., *Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Vif with Gag and Gag-Pol precursors: co-encapsidation and interference with viral protease-mediated Gag processing*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 11): p. 2719-33.
221. Hassaine, G., et al., *The tyrosine kinase Hck is an inhibitor of HIV-1 replication counteracted by the viral vif protein*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 16885-93.
222. Strebel, K., *HIV accessory genes Vif and Vpu*. Adv Pharmacol, 2007. **55**: p. 199-232.
223. Cohen, E.A., et al., *Identification of HIV-1 vpr product and function*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1990. **3**(1): p. 11-8.
224. Popov, S., et al., *Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex*. Embo J, 1998. **17**(4): p. 909-17.
225. Schubert, U., et al., *The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains*. J Virol, 1996. **70**(2): p. 809-19.
226. Rambaut, A., et al., *The causes and consequences of HIV evolution*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(1): p. 52-61.
227. Furuta, R.A., M. Nishikawa, and J. Fujisawa, *Real-time analysis of human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated membrane fusion by fluorescence resonance energy transfer*. Microbes Infect, 2006. **8**(2): p. 520-32.
228. Freed, E.O., *HIV-1 replication*. Somat Cell Mol Genet, 2001. **26**(1-6): p. 13-33.
229. McDonald, D., et al., *Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells*. J Cell Biol, 2002. **159**(3): p. 441-52.
230. Ono, A. and E.O. Freed, *Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13925-30.
231. Simon, V. and D.D. Ho, *HIV-1 dynamics in vivo: implications for therapy*. Nat Rev Microbiol, 2003. **1**(3): p. 181-90.

232. Cooper, D.A., et al., *Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion.* Lancet, 1985. **1**(8428): p. 537-40.
233. Daar, E.S., et al., *Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection.* N Engl J Med, 1991. **324**(14): p. 961-4.
234. Pantaleo, G., et al., *HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease.* Nature, 1993. **362**(6418): p. 355-8.
235. Tindall, B. and D.A. Cooper, *Primary HIV infection: host responses and intervention strategies.* Aids, 1991. **5**(1): p. 1-14.
236. Koup, R.A., et al., *Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome.* J Virol, 1994. **68**(7): p. 4650-5.
237. Kooper, D.P., et al., *Management of benign lymphoepithelial lesions of the parotid gland in human immunodeficiency virus-positive patients.* Eur Arch Otorhinolaryngol, 1998. **255**(8): p. 427-9.
238. Kahn, J.O. and B.D. Walker, *Acute human immunodeficiency virus type 1 infection.* N Engl J Med, 1998. **339**(1): p. 33-9.
239. Veazey, R.S., et al., *Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection.* Science, 1998. **280**(5362): p. 427-31.
240. Veazey, R., et al., *Decreased CCR5 expression on CD4+ T cells of SIV-infected sooty mangabeys.* AIDS Res Hum Retroviruses, 2003. **19**(3): p. 227-33.
241. Brenchley, J.M., et al., *CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract.* J Exp Med, 2004. **200**(6): p. 749-59.
242. Mehandru, S., et al., *Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract.* J Exp Med, 2004. **200**(6): p. 761-70.
243. Mattapallil, J.J., et al., *Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection.* Nature, 2005. **434**(7037): p. 1093-7.
244. Haigwood, N.L. and L. Stamatatos, *Role of neutralizing antibodies in HIV infection.* Aids, 2003. **17 Suppl 4**: p. S67-71.
245. Pilgrim, A.K., et al., *Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection.* J Infect Dis, 1997. **176**(4): p. 924-32.
246. Mellors, J.W., et al., *Novel mutations in reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 reduce susceptibility to foscarnet in laboratory and clinical isolates.* Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(5): p. 1087-92.
247. Mellors, J.W., et al., *Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion.* Ann Intern Med, 1995. **122**(8): p. 573-9.
248. Hogan, C.M. and S.M. Hammer, *Host determinants in HIV infection and disease. Part 1: cellular and humoral immune responses.* Ann Intern Med, 2001. **134**(9 Pt 1): p. 761-76.
249. Rowland-Jones, S.L., *Timeline: AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us?* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(4): p. 343-8.
250. Hessol, N.A., et al., *Progression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection among homosexual men in hepatitis B vaccine trial cohorts in Amsterdam, New York City, and San Francisco, 1978-1991.* Am J Epidemiol, 1994. **139**(11): p. 1077-87.
251. Lemp, G.F., et al., *Projections of AIDS morbidity and mortality in San Francisco.* Jama, 1990. **263**(11): p. 1497-501.

252. Clerici, M., et al., *Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients. Independence of CD4+ cell numbers and clinical staging.* J Clin Invest, 1989. **84**(6): p. 1892-9.
253. Clerici, M., et al., *Interleukin-2 production used to detect antigenic peptide recognition by T-helper lymphocytes from asymptomatic HIV-seropositive individuals.* Nature, 1989. **339**(6223): p. 383-5.
254. Hellerstein, M.K., et al., *Subpopulations of long-lived and short-lived T cells in advanced HIV-1 infection.* J Clin Invest, 2003. **112**(6): p. 956-66.
255. Galati, D., et al., *Specific changes in the posttranslational regulation of nucleolin in lymphocytes from patients infected with human immunodeficiency virus.* J Infect Dis, 2003. **188**(10): p. 1483-91.
256. McMichael, A.J., et al., *The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development.* Nat Rev Immunol. **10**(1): p. 11-23.
257. Schuitemaker, H., et al., *Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocyctotropic to T-cell-tropic virus population.* J Virol, 1992. **66**(3): p. 1354-60.
258. Richman, D.D., *Emergence of mutant HIV reverse transcriptase conferring resistance to AZT.* J Enzyme Inhib, 1992. **6**(1): p. 55-64.
259. Maas, J.J., et al., *Strong association between failure of T cell homeostasis and the syncytium-inducing phenotype among HIV-1-infected men in the Amsterdam Cohort Study.* Aids, 2000. **14**(9): p. 1155-61.
260. Jeang, K.T., H. Xiao, and E.A. Rich, *Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat.* J Biol Chem, 1999. **274**(41): p. 28837-40.
261. Campbell, G.R., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 subtype C Tat fails to induce intracellular calcium flux and induces reduced tumor necrosis factor production from monocytes.* J Virol, 2007. **81**(11): p. 5919-28.
262. Foucault, M., et al., *UV and X-ray structural studies of a 101-residue long Tat protein from a HIV-1 primary isolate and of its mutated, detoxified, vaccine candidate.* Proteins. **78**(6): p. 1441-56.
263. Loret, E.P., et al., *Circular dichroism and molecular modeling yield a structure for the complex of human immunodeficiency virus type 1 trans-activation response RNA and the binding region of Tat, the trans-acting transcriptional activator.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(20): p. 9734-8.
264. Peloponese, J.M., Jr., et al., *1H-13C nuclear magnetic resonance assignment and structural characterization of HIV-1 Tat protein.* C R Acad Sci III, 2000. **323**(10): p. 883-94.
265. Opi, S., et al., *Tat HIV-1 primary and tertiary structures critical to immune response against non-homologous variants.* J Biol Chem, 2002. **277**(39): p. 35915-9.
266. Egele, C., et al., *Modulation of microtubule assembly by the HIV-1 Tat protein is strongly dependent on zinc binding to Tat.* Retrovirology, 2008. **5**: p. 62.
267. de Mareuil, J., et al., *HIV-1 Tat protein enhances microtubule polymerization.* Retrovirology, 2005. **2**: p. 5.
268. Peloponese, J.M., Jr., et al., *Full peptide synthesis, purification, and characterization of six Tat variants. Differences observed between HIV-1 isolates from Africa and other continents.* J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 11473-8.
269. Kuppaswamy, M., et al., *Multiple functional domains of Tat, the trans-activator of HIV-1, defined by mutational analysis.* Nucleic Acids Res, 1989. **17**(9): p. 3551-61.

270. Gregoire, C., et al., *Homonuclear (1)H-NMR assignment and structural characterization of human immunodeficiency virus type 1 Tat Mal protein*. Biopolymers, 2001. **62**(6): p. 324-35.
271. Watkins, J.D., et al., *Homonuclear 1H NMR and circular dichroism study of the HIV-1 Tat Eli variant*. Retrovirology, 2008. **5**: p. 83.
272. Vendel, A.C., S.J. McBryant, and K.J. Lumb, *KIX-mediated assembly of the CBP-CREB-HTLV-1 tax coactivator-activator complex*. Biochemistry, 2003. **42**(43): p. 12481-7.
273. Hauber, J., M.H. Malim, and B.R. Cullen, *Mutational analysis of the conserved basic domain of human immunodeficiency virus tat protein*. J Virol, 1989. **63**(3): p. 1181-7.
274. Ruben, S., et al., *Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein*. J Virol, 1989. **63**(1): p. 1-8.
275. Berkhout, B., R.H. Silverman, and K.T. Jeang, *Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target*. Cell, 1989. **59**(2): p. 273-82.
276. Vives, E., P. Brodin, and B. Lebleu, *A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus*. J Biol Chem, 1997. **272**(25): p. 16010-7.
277. Apolloni, A., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 protease regulation of tat activity is essential for efficient reverse transcription and replication*. J Virol, 2003. **77**(18): p. 9912-21.
278. Barillari, G., et al., *The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1, a growth factor for AIDS Kaposi sarcoma and cytokine-activated vascular cells, induces adhesion of the same cell types by using integrin receptors recognizing the RGD amino acid sequence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(17): p. 7941-5.
279. Gregoire, C.J. and E.P. Loret, *Conformational heterogeneity in two regions of TAT results in structural variations of this protein as a function of HIV-1 isolates*. J Biol Chem, 1996. **271**(37): p. 22641-6.
280. Koken, S.E., et al., *Intracellular analysis of in vitro modified HIV Tat protein*. J Biol Chem, 1994. **269**(11): p. 8366-75.
281. Campbell, G.R. and E.P. Loret, *What does the structure-function relationship of the HIV-1 Tat protein teach us about developing an AIDS vaccine?* Retrovirology, 2009. **6**: p. 50.
282. Lecoq, A., et al., *Increasing the humoral immunogenic properties of the HIV-1 Tat protein using a ligand-stabilizing strategy*. Vaccine, 2008. **26**(21): p. 2615-26.
283. Tahirov, T.H., et al., *Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb*. Nature. **465**(7299): p. 747-51.
284. Gallo, R.C., *Tat as one key to HIV-induced immune pathogenesis and Tat (correction of Pat) toxoid as an important component of a vaccine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8324-6.
285. Ensoli, B., et al., *Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation*. J Virol, 1993. **67**(1): p. 277-87.
286. Richman, D.D., et al., *The challenge of finding a cure for HIV infection*. Science, 2009. **323**(5919): p. 1304-7.
287. Wong, K., et al., *HIV-1 Tat interactions with p300 and PCAF transcriptional coactivators inhibit histone acetylation and neurotrophin signaling through CREB*. J Biol Chem, 2005. **280**(10): p. 9390-9.
288. Yedavalli, V.S., M. Benkirane, and K.T. Jeang, *Tat and trans-activation-responsive (TAR) RNA-independent induction of HIV-1 long terminal repeat by human and murine cyclin T1 requires Sp1*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 6404-10.

289. Pumfery, A., et al., *Chromatin remodeling and modification during HIV-1 Tat-activated transcription*. Curr HIV Res, 2003. **1**(3): p. 343-62.
290. Deng, L., et al., *Acetylation of HIV-1 Tat by CBP/P300 increases transcription of integrated HIV-1 genome and enhances binding to core histones*. Virology, 2000. **277**(2): p. 278-95.
291. Deng, L., et al., *Enhancement of the p300 HAT activity by HIV-1 Tat on chromatin DNA*. Virology, 2001. **289**(2): p. 312-26.
292. D'Orso, I. and A.D. Frankel, *Tat acetylation modulates assembly of a viral-host RNA-protein transcription complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(9): p. 3101-6.
293. Williams, S.A., et al., *NF-kappaB p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation*. Embo J, 2006. **25**(1): p. 139-49.
294. Pagans, S., et al., *SIRT1 regulates HIV transcription via Tat deacetylation*. PLoS Biol, 2005. **3**(2): p. e41.
295. Zhou, M., et al., *The Tat/TAR-dependent phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain stimulates cotranscriptional capping of HIV-1 mRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 12666-71.
296. Demarchi, F., M.I. Gutierrez, and M. Giacca, *Human immunodeficiency virus type 1 tat protein activates transcription factor NF-kappaB through the cellular interferon-inducible, double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR*. J Virol, 1999. **73**(8): p. 7080-6.
297. Li, J.C., et al., *Mechanisms for HIV Tat upregulation of IL-10 and other cytokine expression: kinase signaling and PKR-mediated immune response*. FEBS Lett, 2005. **579**(14): p. 3055-62.
298. Rossi, A., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Tat prevents dephosphorylation of Sp1 by TCF-4 in astrocytes*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 6): p. 1613-23.
299. Zauli, G., et al., *HIV-1 Tat protein down-regulates CREB transcription factor expression in PC12 neuronal cells through a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/cyclic nucleoside phosphodiesterase pathway*. Faseb J, 2001. **15**(2): p. 483-91.
300. Harrich, D., et al., *Tat is required for efficient HIV-1 reverse transcription*. Embo J, 1997. **16**(6): p. 1224-35.
301. Rayne, F., et al., *Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphate enables efficient secretion of HIV-1 Tat by infected T-cells*. Embo J. **29**(8): p. 1348-62.
302. Ferrari, A., et al., *Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time*. Mol Ther, 2003. **8**(2): p. 284-94.
303. Zheng, L., et al., *Extracellular HIV Tat and Tat cysteine rich peptide increase CCR5 expression in monocytes*. J Zhejiang Univ Sci B, 2005. **6**(7): p. 668-72.
304. Westendorp, M.O., et al., *Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120*. Nature, 1995. **375**(6531): p. 497-500.
305. Xiao, H., et al., *Selective CXCR4 antagonism by Tat: implications for in vivo expansion of coreceptor use by HIV-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(21): p. 11466-71.
306. Rappaport, J., et al., *Molecular pathway involved in HIV-1-induced CNS pathology: role of viral regulatory protein, Tat*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(4): p. 458-65.
307. Gutheil, W.G., et al., *Human immunodeficiency virus 1 Tat binds to dipeptidyl aminopeptidase IV (CD26): a possible mechanism for Tat's immunosuppressive activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(14): p. 6594-8.
308. Albin, A., et al., *HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(22): p. 13153-8.

309. Ranga, U., et al., *Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 subtype C strains is a defective chemokine*. J Virol, 2004. **78**(5): p. 2586-90.
310. Zocchi, M.R., A. Poggi, and A. Rubartelli, *The RGD-containing domain of exogenous HIV-1 Tat inhibits the engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells*. Aids, 1997. **11**(10): p. 1227-35.
311. Zocchi, M.R., et al., *HIV-1 Tat inhibits human natural killer cell function by blocking L-type calcium channels*. J Immunol, 1998. **161**(6): p. 2938-43.
312. Albini, A., et al., *The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells*. Nat Med, 1996. **2**(12): p. 1371-5.
313. Liu, Y., et al., *Uptake of HIV-1 tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands*. Nat Med, 2000. **6**(12): p. 1380-7.
314. Sabatier, J.M., et al., *Evidence for neurotoxic activity of tat from human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 1991. **65**(2): p. 961-7.
315. Ziegler, A. and J. Seelig, *Interaction of the protein transduction domain of HIV-1 TAT with heparan sulfate: binding mechanism and thermodynamic parameters*. Biophys J, 2004. **86**(1 Pt 1): p. 254-63.
316. Tyagi, M., et al., *Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans*. J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3254-61.
317. Frankel, A.D. and C.O. Pabo, *Fingering too many proteins*. Cell, 1988. **53**(5): p. 675.
318. Green, M. and P.M. Loewenstein, *Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein*. Cell, 1988. **55**(6): p. 1179-88.
319. Futaki, S., et al., *Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery*. J Biol Chem, 2001. **276**(8): p. 5836-40.
320. Mann, D.A. and A.D. Frankel, *Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein*. Embo J, 1991. **10**(7): p. 1733-9.
321. Richard, J.P., et al., *Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors*. J Biol Chem, 2005. **280**(15): p. 15300-6.
322. Nakase, I., et al., *Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement*. Mol Ther, 2004. **10**(6): p. 1011-22.
323. Wadia, J.S., R.V. Stan, and S.F. Dowdy, *Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis*. Nat Med, 2004. **10**(3): p. 310-5.
324. Kaplan, I.M., J.S. Wadia, and S.F. Dowdy, *Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis*. J Control Release, 2005. **102**(1): p. 247-53.
325. Fretz, M., et al., *Effects of Na⁺/H⁺ exchanger inhibitors on subcellular localisation of endocytic organelles and intracellular dynamics of protein transduction domains HIV-TAT peptide and octaarginine*. J Control Release, 2006. **116**(2): p. 247-54.
326. Fittipaldi, A., et al., *Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 34141-9.
327. Fra, A.M., et al., *Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae*. J Biol Chem, 1994. **269**(49): p. 30745-8.
328. Lamaze, C., et al., *Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway*. Mol Cell, 2001. **7**(3): p. 661-71.
329. Marcello, A., et al., *Visualization of in vivo direct interaction between HIV-1 TAT and human cyclin T1 in specific subcellular compartments by fluorescence resonance energy transfer*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 39220-5.

330. Ezhevsky, S.A., et al., *Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10699-704.
331. Fawell, S., et al., *Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(2): p. 664-8.
332. Brady, H.J., et al., *Altered cytokine expression in T lymphocytes from human immunodeficiency virus Tat transgenic mice*. J Virol, 1995. **69**(12): p. 7622-9.
333. Nath, A., et al., *Transient exposure to HIV-1 Tat protein results in cytokine production in macrophages and astrocytes. A hit and run phenomenon*. J Biol Chem, 1999. **274**(24): p. 17098-102.
334. Poggi, A., A. Rubartelli, and M.R. Zocchi, *Involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels in human dendritic cell function. Competition by HIV-1 Tat*. J Biol Chem, 1998. **273**(13): p. 7205-9.
335. Rautonen, J., et al., *HIV type 1 Tat protein induces immunoglobulin and interleukin 6 synthesis by uninfected peripheral blood mononuclear cells*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1994. **10**(7): p. 781-5.
336. Rautonen, N., et al., *HIV-1 Tat induces cytokine synthesis by uninfected mononuclear cells*. Aids, 1994. **8**(10): p. 1504-6.
337. Scala, G., et al., *The expression of the interleukin 6 gene is induced by the human immunodeficiency virus 1 TAT protein*. J Exp Med, 1994. **179**(3): p. 961-71.
338. Westendorp, M.O., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Tat upregulates interleukin-2 secretion in activated T cells*. J Virol, 1994. **68**(7): p. 4177-85.
339. Ju, S.M., et al., *Extracellular HIV-1 Tat up-regulates expression of matrix metalloproteinase-9 via a MAPK-NF-kappaB dependent pathway in human astrocytes*. Exp Mol Med, 2009. **41**(2): p. 86-93.
340. Mayol, K., et al., *Design and characterization of an HIV-1 Tat mutant: inactivation of viral and cellular functions but not antigenicity*. Vaccine, 2007. **25**(32): p. 6047-60.
341. Mayne, M., et al., *Release of calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-regulated stores by HIV-1 Tat regulates TNF-alpha production in human macrophages*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6538-42.
342. Matsui, M., et al., *Effects of HIV-1 Tat on expression of HLA class I molecules*. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1996. **11**(3): p. 233-40.
343. Gupta, S., et al., *HIV-1 Tat suppresses gp120-specific T cell response in IL-10-dependent manner*. J Immunol, 2008. **180**(1): p. 79-88.
344. Poggi, A. and M.R. Zocchi, *HIV-1 Tat triggers TGF-beta production and NK cell apoptosis that is prevented by pertussis toxin B*. Clin Dev Immunol, 2006. **13**(2-4): p. 369-72.
345. Yang, Y., et al., *Monocytes treated with human immunodeficiency virus Tat kill uninfected CD4(+) cells by a tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand-mediated mechanism*. J Virol, 2003. **77**(12): p. 6700-8.
346. Li, C.J., et al., *Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein*. Science, 1995. **268**(5209): p. 429-31.
347. Gandhi, N., et al., *Differential effects of HIV type 1 clade B and clade C Tat protein on expression of proinflammatory and antiinflammatory cytokines by primary monocytes*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2009. **25**(7): p. 691-9.
348. Fanales-Belasio, E., et al., *Native HIV-1 Tat protein targets monocyte-derived dendritic cells and enhances their maturation, function, and antigen-specific T cell responses*. J Immunol, 2002. **168**(1): p. 197-206.

349. Ito, M., et al., *HIV type 1 Tat protein inhibits interleukin 12 production by human peripheral blood mononuclear cells*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1998. **14**(10): p. 845-9.
350. Lawrence, D.M. and E.O. Major, *HIV-1 and the brain: connections between HIV-1-associated dementia, neuropathology and neuroimmunology*. Microbes Infect, 2002. **4**(3): p. 301-8.
351. Toda, N. and M. Nakanishi-Toda, *Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy*. Prog Retin Eye Res, 2007. **26**(3): p. 205-38.
352. Turchan, J., et al., *Oxidative stress in HIV demented patients and protection ex vivo with novel antioxidants*. Neurology, 2003. **60**(2): p. 307-14.
353. Haughey, N.J. and M.P. Mattson, *Calcium dysregulation and neuronal apoptosis by the HIV-1 proteins Tat and gp120*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2002. **31 Suppl 2**: p. S55-61.
354. Pocernich, C.B., et al., *HIV-dementia, Tat-induced oxidative stress, and antioxidant therapeutic considerations*. Brain Res Brain Res Rev, 2005. **50**(1): p. 14-26.
355. El-Hage, N., et al., *Synergistic increases in intracellular Ca²⁺, and the release of MCP-1, RANTES, and IL-6 by astrocytes treated with opiates and HIV-1 Tat*. Glia, 2005. **50**(2): p. 91-106.
356. Chauhan, A., et al., *Intracellular human immunodeficiency virus Tat expression in astrocytes promotes astrocyte survival but induces potent neurotoxicity at distant sites via axonal transport*. J Biol Chem, 2003. **278**(15): p. 13512-9.
357. Hudson, L., et al., *Detection of the human immunodeficiency virus regulatory protein tat in CNS tissues*. J Neurovirol, 2000. **6**(2): p. 145-55.
358. Wiley, C.A., M. Baldwin, and C.L. Achim, *Expression of HIV regulatory and structural mRNA in the central nervous system*. Aids, 1996. **10**(8): p. 843-7.
359. Price, T.O., et al., *HIV-1 viral proteins gp120 and Tat induce oxidative stress in brain endothelial cells*. Brain Res, 2005. **1045**(1-2): p. 57-63.
360. Cheng, J., et al., *Neuronal excitatory properties of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein*. Neuroscience, 1998. **82**(1): p. 97-106.
361. Johnston, J.B., et al., *HIV-1 Tat neurotoxicity is prevented by matrix metalloproteinase inhibitors*. Ann Neurol, 2001. **49**(2): p. 230-41.
362. Toborek, M., et al., *HIV-Tat protein induces oxidative and inflammatory pathways in brain endothelium*. J Neurochem, 2003. **84**(1): p. 169-79.
363. Griffin, D.E., *Cytokines in the brain during viral infection: clues to HIV-associated dementia*. J Clin Invest, 1997. **100**(12): p. 2948-51.
364. Canki, M., et al., *Isolation and long-term culture of primary ocular human immunodeficiency virus type 1 isolates in primary astrocytes*. J Neurovirol, 1997. **3**(1): p. 10-5.
365. Lai, Y., et al., *Selectively increasing inducible heat shock protein 70 via TAT-protein transduction protects neurons from nitrosative stress and excitotoxicity*. J Neurochem, 2005. **94**(2): p. 360-6.
366. Aoki, Y. and G. Tosato, *HIV-1 Tat enhances Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) infectivity*. Blood, 2004. **104**(3): p. 810-4.
367. Gorrill, T., et al., *Activation of early gene transcription in polyomavirus BK by human immunodeficiency virus type 1 Tat*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 6): p. 1557-66.
368. Miller, D.C., et al., *Foxp3 staining in BK virus allograft nephropathy and comparison with acute cellular rejection*. Transplant Proc, 2009. **41**(10): p. 4188-92.
369. Bernard-Gallon, D., et al., *DNA repair gene ERCC2 polymorphisms and associations with breast and ovarian cancer risk*. Mol Cancer, 2008. **7**: p. 36.

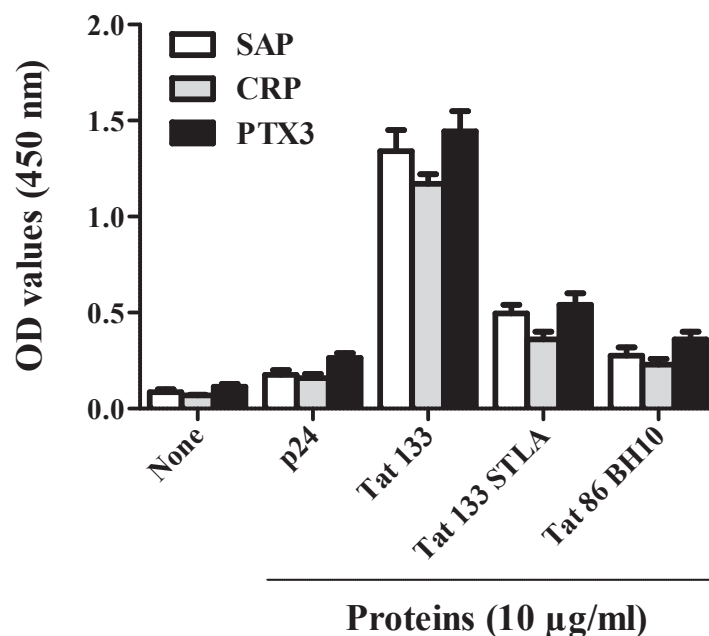
370. Bowater, R.P., R.H. Borts, and M.F. White, *DNA damage: from causes to cures*. Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 3): p. 479-81.
371. Nunnari, G., J.A. Smith, and R. Daniel, *HIV-1 Tat and AIDS-associated cancer: targeting the cellular anti-cancer barrier?* J Exp Clin Cancer Res, 2008. **27**: p. 3.
372. Sun, Y., et al., *HIV-1 Tat depresses DNA-PK(CS) expression and DNA repair, and sensitizes cells to ionizing radiation*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006. **65**(3): p. 842-50.
373. Toschi, E., et al., *HIV-1 Tat regulates endothelial cell cycle progression via activation of the Ras/ERK MAPK signaling pathway*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(4): p. 1985-94.
374. van Baalen, C.A., et al., *The choice of antigen for therapeutic immunization against AIDS*. Trends Immunol, 2002. **23**(10): p. 478-9.
375. Stittelaar, K.J., et al., *Comparison of the efficacy of early versus late viral proteins in vaccination against SIV*. Vaccine, 2002. **20**(23-24): p. 2921-7.
376. Ensoli, B. and A. Cafaro, *HIV-1 Tat vaccines*. Virus Res, 2002. **82**(1-2): p. 91-101.
377. Addo, M.M., et al., *The HIV-1 regulatory proteins Tat and Rev are frequently targeted by cytotoxic T lymphocytes derived from HIV-1-infected individuals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1781-6.
378. Cafaro, A., et al., *Control of SHIV-89.6P-infection of cynomolgus monkeys by HIV-1 Tat protein vaccine*. Nat Med, 1999. **5**(6): p. 643-50.
379. Cafaro, A., et al., *Vaccination with DNA containing tat coding sequences and unmethylated CpG motifs protects cynomolgus monkeys upon infection with simian/human immunodeficiency virus (SHIV89.6P)*. Vaccine, 2001. **19**(20-22): p. 2862-77.
380. Maggiorella, M.T., et al., *Long-term protection against SHIV89.6P replication in HIV-1 Tat vaccinated cynomolgus monkeys*. Vaccine, 2004. **22**(25-26): p. 3258-69.
381. Goldstein, G., et al., *Minimization of chronic plasma viremia in rhesus macaques immunized with synthetic HIV-1 Tat peptides and infected with a chimeric simian/human immunodeficiency virus (SHIV33)*. Vaccine, 2000. **18**(25): p. 2789-95.
382. Allen, T.M., et al., *Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia*. Nature, 2000. **407**(6802): p. 386-90.
383. Silvera, P., et al., *Outcome of simian-human immunodeficiency virus strain 89.6p challenge following vaccination of rhesus macaques with human immunodeficiency virus Tat protein*. J Virol, 2002. **76**(8): p. 3800-9.
384. Pauza, C.D., et al., *Vaccination with tat toxoid attenuates disease in simian/HIV-challenged macaques*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3515-9.
385. Hel, Z., et al., *Improved vaccine protection from simian AIDS by the addition of nonstructural simian immunodeficiency virus genes*. J Immunol, 2006. **176**(1): p. 85-96.
386. Osterhaus, A.D., et al., *Isolation and partial characterization of a lentivirus from talapoin monkeys (Myopithecus talapoin)*. Virology, 1999. **260**(1): p. 116-24.
387. van Kooyk, Y. and T.B. Geijtenbeek, *A novel adhesion pathway that regulates dendritic cell trafficking and T cell interactions*. Immunol Rev, 2002. **186**: p. 47-56.
388. Gulow, K., et al., *HIV-1 trans-activator of transcription substitutes for oxidative signaling in activation-induced T cell death*. J Immunol, 2005. **174**(9): p. 5249-60.
389. Fittipaldi, A. and M. Giacca, *Transcellular protein transduction using the Tat protein of HIV-1*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(4): p. 597-608.
390. Caldwell, R.L., B.S. Egan, and V.L. Shepherd, *HIV-1 Tat represses transcription from the mannose receptor promoter*. J Immunol, 2000. **165**(12): p. 7035-41.
391. Fanales-Belasio, E., et al., *HIV-1 Tat-based vaccines: from basic science to clinical trials*. DNA Cell Biol, 2002. **21**(9): p. 599-610.

392. McCloskey, T.W., et al., *Dual role of HIV Tat in regulation of apoptosis in T cells*. J Immunol, 1997. **158**(2): p. 1014-9.
393. Schroder, A.R., et al., *HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots*. Cell, 2002. **110**(4): p. 521-9.
394. Gibellini, D., et al., *HIV-1 Tat protein concomitantly down-regulates apical caspase-10 and up-regulates c-FLIP in lymphoid T cells: a potential molecular mechanism to escape TRAIL cytotoxicity*. J Cell Physiol, 2005. **203**(3): p. 547-56.
395. Malleret, B., et al., *Effect of SIVmac infection on plasmacytoid and CD1c+ myeloid dendritic cells in cynomolgus macaques*. Immunology, 2008. **124**(2): p. 223-33.
396. Goldstein, G., *HIV-1 Tat protein as a potential AIDS vaccine*. Nat Med, 1996. **2**(9): p. 960-4.
397. Xiao, H., et al., *TIP30 has an intrinsic kinase activity required for up-regulation of a subset of apoptotic genes*. Embo J, 2000. **19**(5): p. 956-63.
398. Kepley, C.L., et al., *Co-aggregation of FcgammaRII with FcepsilonRI on human mast cells inhibits antigen-induced secretion and involves SHIP-Grb2-Dok complexes*. J Biol Chem, 2004. **279**(34): p. 35139-49.
399. Hulett, M.D. and P.M. Hogarth, *Molecular basis of Fc receptor function*. Adv Immunol, 1994. **57**: p. 1-127.
400. de Haas, M., et al., *Fc gamma receptors of phagocytes*. J Lab Clin Med, 1995. **126**(4): p. 330-41.
401. Fridman, W.H., et al., *Soluble Fc gamma receptors*. J Leukoc Biol, 1993. **54**(5): p. 504-12.
402. Ortiz-Stern, A. and C. Rosales, *Cross-talk between Fc receptors and integrins*. Immunol Lett, 2003. **90**(2-3): p. 137-43.
403. Reth, M., *Antigen receptor tail clue*. Nature, 1989. **338**(6214): p. 383-4.
404. Micklem, K.J., et al., *Different isoforms of human FcRII distinguished by CDw32 antibodies*. J Immunol, 1990. **144**(6): p. 2295-303.
405. Ziegler-Heitbrock, H.W., B. Passlick, and D. Flieger, *The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood*. Hybridoma, 1988. **7**(6): p. 521-7.
406. Kwakkenbos, M.J., et al., *The human EGF-TM7 family member EMR2 is a heterodimeric receptor expressed on myeloid cells*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(5): p. 854-62.
407. Rothe, G., et al., *Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(12): p. 1437-47.
408. Almeida, J., et al., *Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical, and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage(-)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(-/lo) cells, CD14(+) monocytes, and CD16(-) dendritic cells*. Clin Immunol, 2001. **100**(3): p. 325-38.
409. Siedlar, M., et al., *The M-DC8-positive leukocytes are a subpopulation of the CD14+ CD16+ monocytes*. Immunobiology, 2000. **202**(1): p. 11-7.
410. Sanchez-Torres, C., et al., *CD16+ and CD16- human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4+ T cells*. Int Immunol, 2001. **13**(12): p. 1571-81.
411. Krutzik, S.R., et al., *TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells*. Nat Med, 2005. **11**(6): p. 653-60.
412. Ji, X., H. Gewurz, and G.T. Spear, *Mannose binding lectin (MBL) and HIV*. Mol Immunol, 2005. **42**(2): p. 145-52.

413. Bottazzi, B., et al., *Pentraxins as a key component of innate immunity*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(1): p. 10-5.
414. Lu, J., et al., *Structural recognition and functional activation of FcγR by innate pentraxins*. Nature, 2008. **456**(7224): p. 989-92.
415. Dehovitz, J.A., et al., *High sensitivity C-reactive protein and response to highly active antiretroviral therapy in women with HIV-1 infection*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2006. **42**(3): p. 383-4.
416. Drain, P.K., et al., *C-reactive protein independently predicts HIV-related outcomes among women and children in a resource-poor setting*. Aids, 2007. **21**(15): p. 2067-75.
417. Lau, B., et al., *C-reactive protein is a marker for human immunodeficiency virus disease progression*. Arch Intern Med, 2006. **166**(1): p. 64-70.
418. Chaudhary, M., et al., *Role of C-reactive protein in HIV infection: a pilot study*. Viral Immunol, 2008. **21**(2): p. 263-6.
419. Feldman, J.G., et al., *C-reactive protein is an independent predictor of mortality in women with HIV-1 infection*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2003. **32**(2): p. 210-4.
420. Kuller, L.H., et al., *Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection*. PLoS Med, 2008. **5**(10): p. e203.
421. Piccioli, D., et al., *Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets*. Blood, 2007. **109**(12): p. 5371-9.
422. Lambotte, O., et al., *Detection of infectious HIV in circulating monocytes from patients on prolonged highly active antiretroviral therapy*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2000. **23**(2): p. 114-9.
423. Cairns, A.P., A.D. Crockard, and A.L. Bell, *The CD14⁺ CD16⁺ monocyte subset in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus*. Rheumatol Int, 2002. **21**(5): p. 189-92.
424. Minskoff, S.A., K. Matter, and I. Mellman, *Fc γRII-B1 regulates the presentation of B cell receptor-bound antigens*. J Immunol, 1998. **161**(5): p. 2079-83.

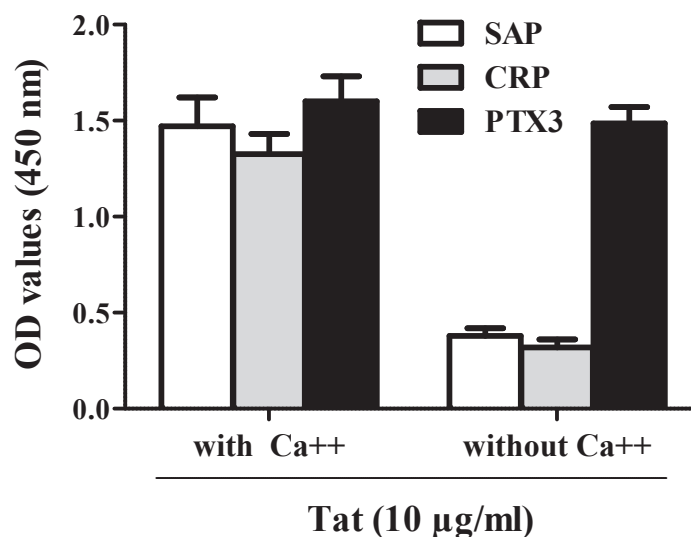
ANNEXE

1



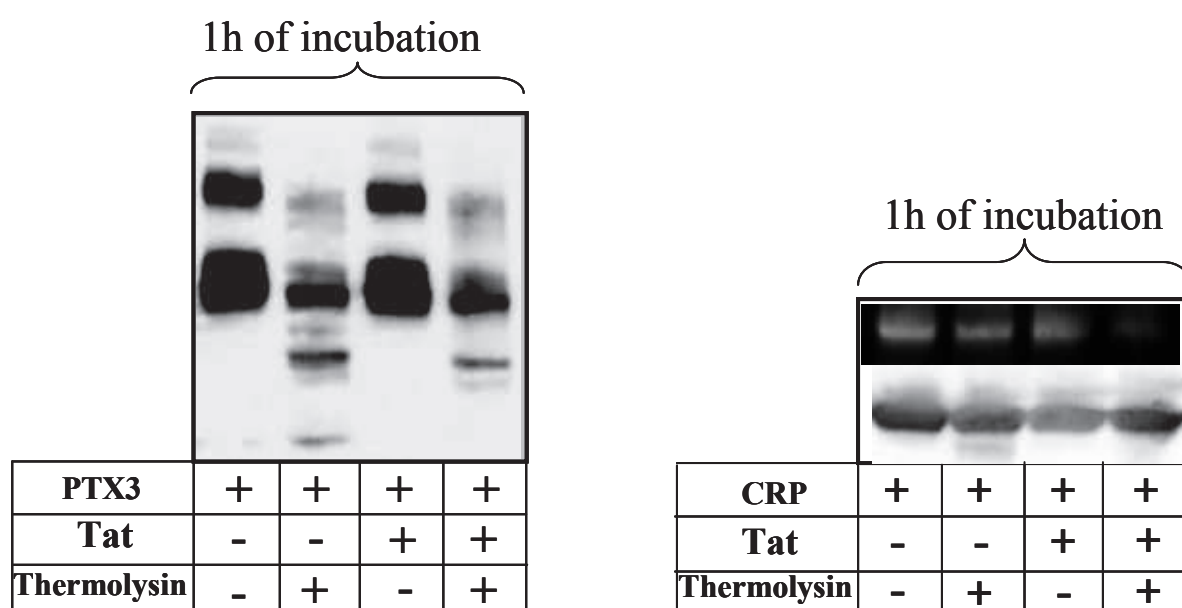
Évaluation par ELISA de l'interaction des pentraxines SAP, CRP et PTX3 avec différentes protéines Tat. Les protéines Tat 133 STLA (protéine synthétique de 101 acides aminés mutée sur les domaines riche en proline, core, basique et RGD) et Tat86 BH10 (protéine de 86 acides aminés obtenue à partir d'une souche de laboratoire) perdent leur capacité d'interaction avec les pentraxines en comparaison de la molécule synthétique Tat 133. Les résultats sont exprimés sous forme de densité optique (mean $\pm$ sd, n=5)

2



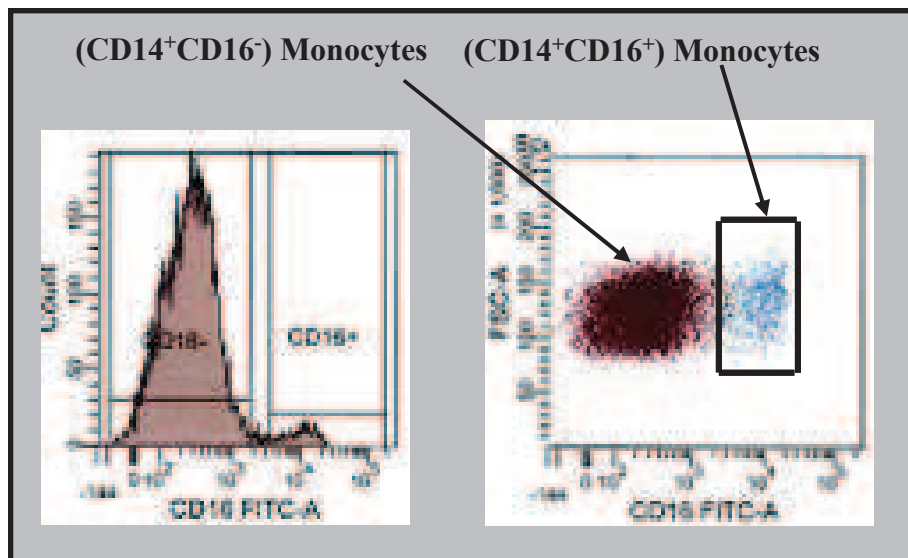
Évaluation de l'interaction de la protéine Tat avec les pentraxines SAP, CRP et PTX3 en présence ou non de calcium. L'interaction des pentraxines avec Tat a été évaluée par ELISA. Les pentraxines courtes (SAP et CRP) perdent leur capacité à interagir avec Tat en l'absence de calcium. L'interaction de la pentraxine longue PTX3 avec Tat n'est pas déterminée par le calcium. Les résultats sont exprimés sous forme de densité optique (mean $\pm$ sd, n=5)

3



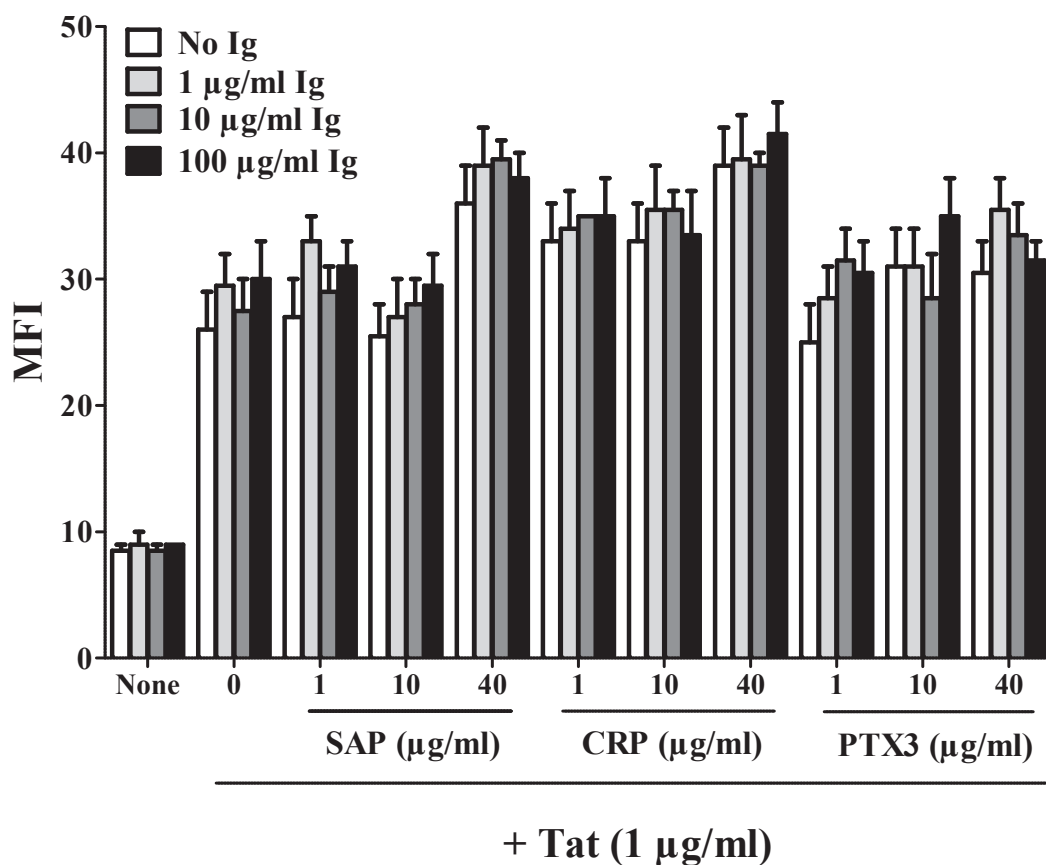
Évaluation par western blotting de la dégradation de PTX3 et CRP par la thermolysine. PTX3 est dégradée par la thermolysine. L'association de Tat avec PTX3 n'empêche pas cette dégradation (profil de gauche). La molécule CRP n'est pas dégradée par la thermolysine (profil de droite). Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

4



Séparation des populations monocytaires. La séparation des sous populations de monocytes (CD14⁺⁺CD16⁻ et CD14⁺CD16⁺) a été réalisée par trieur de cellules FACSaria à partir de monocytes totaux fraîchement isolés puis marqués avec l'anticorps anti-CD16 (clone 3G8, BD pharmingen)

5



Analyse de l'impact des immunoglobulines humaines sur la fixation et/ou l'entrée des complexes Tat/PTX sur les monocytes. Les cellules ont été incubées avec Tat seule couplée à la biotine ou les complexes Tat/PTX. La fixation a été évaluée par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés sous forme de MFI. La protéine Tat se fixe aux monocytes ; cependant sa complexation avec chaque pentraxine n'altère pas sa fixation même en présence d'un excès d'immunoglobulines.

The Journal of Immunology

This information is current as of October 27, 2010

The IL-27 p28 Subunit Binds Cytokine-Like Factor 1 to Form a Cytokine Regulating NK and T Cell Activities Requiring IL-6R for Signaling

Sandrine Crabé, Angélique Guay-Giroux, Aurélie Jeanne Tormo, Dorothee Duluc, Rami Lissilaa, Florence Guilhot, Ulrick Mavoungou-Bigouagou, Fouad Lefouili, Isabelle Cognet, Walter Ferlin, Greg Elson, Pascale Jeannin and Jean-François Gauchat

J. Immunol. 2009;183;7692-7702; originally published online Nov 23, 2009;
 doi:10.4049/jimmunol.0901464
<http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/183/12/7692>

Supplementary Data

<http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/jimmunol.0901464/D.C1>

References

This article **cites 78 articles**, 35 of which can be accessed free at:
<http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/183/12/7692#BIBL>

1 online articles that cite this article can be accessed at:
<http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/183/12/7692#otherarticles>

Subscriptions

Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at <http://www.jimmunol.org/subscriptions/>

Permissions

Submit copyright permission requests at
<http://www.aai.org/ji/copyright.html>

Email Alerts

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up at <http://www.jimmunol.org/subscriptions/etoc.shtml>

The IL-27 p28 Subunit Binds Cytokine-Like Factor 1 to Form a Cytokine Regulating NK and T Cell Activities Requiring IL-6R for Signaling¹

Sandrine Crabé,^{*†} Angélique Guay-Giroux,^{2*} Aurélie Jeanne Tormo,^{2*†} Dorothée Duluc,[‡] Rami Lissilaa,[§] Florence Guilhot,[§] Ulrick Mavoungou-Bigouagou,[‡] Fouad Lefouili,^{*} Isabelle Cognet,^{*} Walter Ferlin,[§] Greg Elson,[§] Pascale Jeannin,^{‡¶} and Jean-François Gauchat^{3*†}

IL-27 is formed by the association of a cytokine subunit, p28, with the soluble cytokine receptor EBV-induced gene 3 (EBI3). The IL-27R comprises gp130 and WSX-1. The marked difference between *EBI3*^{-/-} and *WSX-1*^{-/-} mice suggests that p28 has functions independent of EBI3. We have identified an alternative secreted complex formed by p28 and the soluble cytokine receptor cytokine-like factor 1 (CLF). Like IL-27, p28/CLF is produced by dendritic cells and is biologically active on human NK cells, increasing IL-12- and IL-2-induced IFN- γ production and activation marker expression. Experiments with Ba/F3 transfectants indicate that p28/CLF activates cells expressing IL-6R α in addition to the IL-27R subunits. When tested on CD4 and CD8 T cells, p28/CLF induces IL-6R α -dependent STAT1 and STAT3 phosphorylation. Furthermore, p28/CLF inhibits CD4 T cell proliferation and induces IL-17 and IL-10 secretion. These results indicate that p28/CLF may participate in the regulation of NK and T cell functions by dendritic cells. The p28/CLF complex engages IL-6R and may therefore be useful for therapeutic applications targeting cells expressing this receptor. Blocking IL-6R using humanized mAbs such as tocilizumab has been shown to be beneficial in pathologies like rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. The identification of a new IL-6R ligand is therefore important for a complete understanding of the mechanism of action of this emerging class of immunosuppressors. *The Journal of Immunology*, 2009, 183: 7692–7702.

Interleukin 27 is a composite cytokine formed by the association of a four helix bundle cytokine, p28, with a soluble receptor, Epstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI3) (1). IL-27 is produced by activated APCs (1) and signals through a receptor formed by WSX-1 and gp130 (2). Initial characterization of IL-27 indicated multiple activities, such as the capacity to sustain naive CD4 T cell proliferation, to induce NK cell coactivation, to modulate B cell Ig class switching, and to induce mast cell activation (1–3). Further analysis of IL-27 function using *WSX-1*^{-/-} mice pointed toward a role in Th1 differentiation (4, 5). Recent data indicate an important role in controlling the extent of Th1, Th2 and Th17 responses during acute or chronic infection as well as inflammation (4–12). The molecular mechanisms underlying the IL-27 anti-inflammatory functions on T cells are starting to be deciphered. IL-27 can limit IL-2 production (13, 14), inhibit Th17 differentiation (10, 11), and induce the production of the anti-

inflammatory cytokine IL-10 (15–17). Experimental autoimmune encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis in which Th17 plays a key role, is exacerbated in *WSX-1*^{-/-} mice and prevented by IL-27 administration, suggesting that the properties of IL-27 may be clinically relevant (10, 18).

IL-27 functions have also been studied using *EBI3* knockout. Marked differences have been observed between mice deficient in *EBI3* and *WSX-1*. *EBI3*^{-/-} mice are protected from Con A-induced liver injury, whereas *WSX-1*^{-/-} mice showed exacerbated hepatitis (19, 20). Similarly, naive T cells from *WSX-1*^{-/-} and *EBI3*^{-/-} mice showed opposite phenotypes with respect to IFN- γ production (5, 21). This suggests that p28 exerts biological activities independently of EBI3. Substantiating this hypothesis, p28 can inhibit Th17 differentiation induced by IL-6 and TGF- β in vitro (11).

The IL-27 p28 subunit shares closest homology with IL-11 and cardiotrophin-like cytokine (CLC)⁴ (1). Like p28, CLC requires a soluble cytokine receptor, cytokine-like factor (CLF), to be secreted (22). This prompted us to investigate whether CLF could form a secreted, biologically active complex with p28.

Materials and Methods

Generation of stable HEK-293 transfectants expressing human p28, CLF, p28/CLF, or GFP

The human p28 cDNA (IRAU969H1198D; Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung) was modified by introducing the sequence coding for a carboxyl-terminal protein C epitope (EDQVDPRLIDGK). The

^{*}Département de Pharmacologie and [†]Groupement Universitaire de Recherche sur le Médicament, Université de Montréal, Montréal, Canada; [‡]INSERM Unité 892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, Angers; [§]Université d'Angers, Unité Mixte de Recherche-Santé 892, Angers, France; [¶]NovImmune SA, Plan-les-Ouates, Switzerland; and [¶]Laboratoire d'Immunologie et d'Allergologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers, France

Received for publication May 8, 2009. Accepted for publication October 11, 2009.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (MOP-57832) and by INSERM (Contrat Avenir).

² A.G.-G. and A.J.T. contributed equally to this article.

³ Address correspondence and reprint requests to Dr. Jean-François Gauchat, Département de Pharmacologie, Université de Montréal, Montréal H3T 1J4, Canada. E-mail address: jf.gauchat@umontreal.ca

⁴ Abbreviations used in this paper: CLC, cardiotrophin-like cytokine; CLF, cytokine-like factor 1; CNTF, ciliary neurotrophic factor; EBI3, Epstein-Barr virus-induced gene 3; MFI, mean fluorescence intensity; DC, dendritic cell; BM, bone marrow.

Copyright © 2009 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/09/\$2.00

CLF cDNA (23) was modified by introducing a sequence coding for a FLAG epitope (DYKDDDD) at the COOH terminus of the protein. The p28-protC and CLF-FLAG cDNAs were cloned in the vector pcDNA5 (Invitrogen) alone or as a bicistronic insert containing an internal ribosome entry site and used to generate stable Flp-In-293 (Invitrogen) transfectants as previously described (24).

Purification of human p28/CLF complex

Human p28/CLF was produced using Flp-In-293 cells stably transfected with the p28-protC/CLF-FLAG bicistronic construct. Transfectants were expanded and recombinant p28/CLF was isolated from the culture medium following the procedure described previously for CLC/CLF (24) using LPS-free reagents and glassware. Purified protein batches were dialyzed against RPMI 1640 medium (Invitrogen). LPS contamination was determined using the *Limulus* ameobocyte lysate test (QCL-1000; Cambrex) and was always <0.1 ng/ μ g (1 endotoxin unit/ μ g). Protein concentrations were determined by SDS-PAGE and Coomassie blue staining using BSA as standard.

Production of mouse p28/CLF and mouse "hyper-IL-6"

To generate a bicistronic vector encoding mouse p28 and mouse CLF, the mouse p28 cDNA (RIKEN clone I830047N17) was obtained from the FANTOM Consortium, Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN, Saitama, Japan) Genome Exploration Research Group (provided by K. K. DNAFORM, Ibaraki, Japan). The cDNAs were modified by PCR to generate a bicistronic insert encoding for mouse CLF (23) fused at the carboxyl-terminal to the FLAG epitope and the T2A "self-cleaving" peptide followed by mouse p28 tagged at the CHOO terminus by a protein C epitope and 6 His. For the production of a mouse hyper IL-6 (25), the cDNAs coding for mouse IL-6 α and IL-6 (IMAGE ID 5135770 and 40130735; Open Biosystems) were modified by PCR to generate a single-chain fusion protein encoding for the extracellular domain of IL-6 α fused to the mature form of IL-6 by a GGG(SGGGG)³SHHHHHH linker. The inserts were recloned in the insect expression vector pIB/V5-His (Invitrogen). Stable High Five (Invitrogen) transfectants were generated and expanded in Express Five Medium (Invitrogen) according to the supplier's recommended procedure. The p28/CLF complex and hyper-IL-6 were purified by immobilized metal-affinity chromatography on Ni-NTA agarose (Qiagen) following Qiagen protocol using LPS-free reagent and glassware. Purified proteins were dialyzed, quantified, and analyzed by Western blot for the presence of p28, CLF, or hyper-IL-6 and were tested for LPS contamination as described above for human p28/CLF. Western blot analysis of hyper-IL-6 was revealed using anti-penta His mAb (Qiagen). No CLF/p28 unprocessed fusion protein contamination could be detected in the p28/CLF preparations.

Immunoprecipitations and Western blotting

Flp-In-293 transfectants expressing human p28-protC, CLF-FLAG, and p28-protC/CLF-FLAG were grown as described elsewhere (24). Supernatants were concentrated by ultrafiltration and incubated overnight at 4°C with anti-protein C agarose (Roche Applied Sciences) or anti-FLAG M2-agarose (Sigma-Aldrich). Following extensive washing, the precipitates were analyzed by Western blotting using HRP-conjugated anti-protein C (Roche Applied Sciences) or anti-FLAG mAbs (M2; Sigma-Aldrich) as described previously (22).

Generation of monocyte-derived human dendritic cells (DC)

Human CD14⁺ monocytes were purified by positive selection from PBMC using the MACS technology according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). Cells were cultured in culture medium consisting of RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin supplemented with 20 ng/ml GM-CSF (R&D Systems). Immature DC were differentiated from monocytes cultured for 5 days at 10^6 cells/ml by incubation with 20 ng/ml IL-4 (R&D Systems) for 4 days. DC were activated with 20 ng/ml LPS (Sigma-Aldrich) for 48 h.

Generation of bone marrow (BM)-derived mouse DC

Four- to 6-wk-old female C57BL/6 mice were purchased from The Jackson Laboratory. Femurs and tibiae were removed and the marrow was isolated by flushing. RBC-depleted BM cells were suspended in complete medium (RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin). Cells were adjusted to 2×10^5 cells/ml and incubated in the presence of 20 ng/ml GM-CSF (PeproTech) for 7 days. DC were isolated by centrifuga-

tion on a 14.5% (w/v) Nicodenz cushion (26). To induce maturation, DC isolated at day 7 were cultured in the presence of 1 μ g/ml LPS for 18 h.

Analysis of p28 and CLF mRNA expression by RT-PCR

Expression of p28 and CLF mRNA in human and mouse DC was analyzed by RT-PCR. Briefly, total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen). Single-strand cDNA was synthesized by reverse transcription using 1 μ g of total RNA and random priming. PCR amplification was performed with an amount of cDNA corresponding to 25 ng of starting total RNA using specific oligonucleotides (human CLF, 5'-TACAAGCTTAGGTGGTATGGC-3' and 5'-GGTGGCTCCACTCACTCCAG-3'; human p28, 5'-GAGTTCACAGTCAGCCTGCATCTC-3' and 5'-TGAATCTGTCAGCCAGCACCTG-3'; mouse CLF, 5'-CCTATGAGATCTGGGTGGA-3' and 5'-TGACTTCTGCATCCAAGCAC-3'; and mouse p28, 5'-CTGAATCTCGATTGCCAGGAGT-3' and 5'-GGAGTGAAGGAGCTGGTAGGTA-3'). RNA integrity was assessed by agarose gel electrophoresis and GAPDH or 18S cDNA amplification. The PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel.

Human NK cell purification and activation

CD3⁺CD56⁺ NK cells were purified from PBMC by magnetic-activated cell sorting positive selection followed by FACS sorting using FITC-labeled anti-CD3 and PE-labeled anti-CD56 mAbs (both from BD Biosciences). Throughout the study, the purity of the NK cell populations used was $>99\%$. NK cells at 1×10^6 cells/ml were stimulated with 50 ng/ml human p28/CLF in the absence or presence of either 100 or 500 U/ml IL-2 and either 5 or 25 ng/ml IL-12 (both from R&D Systems) for 48 h in 48-well plates. IFN- γ was then quantified in the cell-free supernatants using capture and detection Abs from Mabtech; sensitivity 4 pg/ml. Membrane CD54 and CD69 expression was evaluated by flow cytometry with FITC-labeled anti-CD54 and CD69 mAbs (Serotec). Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI) after subtracting the MFI obtained with the control Ab.

Cytokine-binding assays

Mouse IL-13R, WSX-1, or IL-6 α cDNA were recloned in the vector pcDNA5 and used to generate Flp-In-293 stable transfectants. IL-13R-, WSX-1-, or IL-6 α -expressing Flp-In-293 transfectants were incubated for 1 h on ice with p28-protC/CLF-FLAG (at 1 μ g/ml). For competition assays, binding was performed in the presence of IL-27 (10 μ g/ml) or mouse ciliary neurotrophic factor (10 μ g/ml). Binding was then revealed with mouse anti-protein C mAb (5 μ g/ml) and Alexa Fluor 633-labeled goat anti-mouse IgG Ab. Dead cells were excluded by propidium iodide staining (1 μ g/ml). Fluorescence was assessed by flow cytometry.

Generation of stable Ba/F3 transfectants

The cDNA coding for mouse gp130 (IMAGE ID 6834623; Open Biosystems) was recloned in the expression vector pMG (InvivoGen/Mediacorp). The cDNAs encoding mouse IL-6 α (IMAGE ID 40130735) and IL-11 α 1 (IMAGE ID 3585497) were recloned in the expression vector pSFFV-Neo (27). Linearized plasmids were transfected in Ba/F3. Stable transfectants were selected using hygromycin (1 mg/ml) and/or geneticin (1 mg/ml). Clones were expanded using mouse IL-6 (25 ng/ml), IL-11 (25 ng/ml), or in-house produced hyper-IL-6 (5 ng/ml).

Measurement of STAT1 and STAT3 activation by flow cytometry

Ba/F3 cells were serum- and cytokine-starved for 4 h. Lymph node cells or Ba/F3 cells were activated for 15 min at 37°C with mouse IL-27 (50 ng/ml; R&D Systems), p28/CLF (50 ng/ml), IL-11 (50 ng/ml), IL-6 (50 ng/ml), or hyper-IL-6 (10 ng/ml). Cells were fixed with 2% formaldehyde for 10 min at 37°C, washed with cold PBS, resuspended in ice-cold Perm-III (BD Biosciences), and incubated on ice for 30 min. After two washes in PBS/2% FBS, cells were stained in PBS/2% FBS for 1 h with either FITC-labeled anti-phospho-STAT1 (Y701) or FITC-labeled anti-phospho-STAT3 (Y705) mAbs at room temperature, washed, and fluorescence analyzed by flow cytometry. When used, anti-IL-6 α and anti-gp130 mAbs (R&D Systems) were added 10 min before cytokine stimulation.

Proliferation assays

Ba/F3 transfectants (5×10^3 cells/well in 96-well plates) were incubated in triplicates with indicated dilutions of recombinant proteins for 72 h in RPMI 1640 supplemented with 5% FBS. Proliferation was measured using a fluorometric assay (Alamar blue; Serotec). Fluorescence was measured at 590 nm (excitation wavelength, 530 nm) with a Wallac Victor2 1420 Multilabel Microplate Reader (PerkinElmer Life and Analytical Sciences).

CD4 T cell differentiation assays

Spleen and lymph node CD4 T cells were enriched by magnetic bead depletion of CD8 and NK cells according to the manufacturer's instructions (StemCell Technologies). Cells were plated in 96-well round-bottom plates (Corning) at a density of 5×10^6 cells/ml. Cells were stimulated with plate-coated anti-CD3 and soluble anti-CD28 (both at 1 μ g/ml; BD Biosciences). Cultures were supplemented with anti-IFN- γ and anti-IL-4 (both at 10 μ g/ml; eBioscience). IL-17 production was induced using human TGF- β (1 ng/ml; Sigma-Aldrich) and IL-6 (10 ng/ml; PeproTech). When added, IL-27 (R&D Systems) and p28/CLF were used at 50 ng/ml. CD4 T cells were supplemented with fresh medium and reagents at day 3. After 4 days of culture, enriched CD4 T cells were restimulated with PMA (50 ng/ml) and ionomycin (1 μ g/ml) for 4 h. During the last 2 h, cytokine secretion was blocked with brefeldin A (5 μ g/ml). Cells were collected and fixed with formaldehyde (2%) for 30 min at room temperature. Cells were permeabilized with saponin (0.5%) and stained with FITC-labeled anti-CD4 (BD Biosciences), allophycocyanin-labeled anti-IFN- γ (BD Biosciences), and PE-labeled anti-IL-17 (eBioscience) for 1 h at room temperature. Fluorescence was measured using a FACSCalibur (BD Biosciences) and data were analyzed with the FlowJo software (Tree Star).

IL-10 secretion assays

For IL-10 secretion assays with purified CD4 T cells, cells were isolated by FACS sorting and stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 as described in the previous section. IL-6, IL-27, and p28/CLF were used at 33 ng/ml. For secretion assays with unfractionated splenocytes, cells were activated with plate-coated anti-CD3 and soluble anti-CD28 (both at 1 μ g/ml) with concentrations of IL-6, IL-27, and p28/CLF ranging from 0 to 600 ng/ml. After 4 d of culture, IL-10 secretion was measured by ELISA (BD Biosciences or R&D Systems) following the manufacturer's instructions.

Proliferation measurements using CFSE

CD4 T cells purified by FACS sorting were stained with CFSE (Molecular Probes) following the manufacturer's instructions. Cells were stimulated with plate-coated anti-CD3 and anti-CD28 mAbs (both at 1 μ g/ml; BD Biosciences) at 2×10^6 cells/ml in 96 round-bottom well plates. For certain experiments, CD4 T cells were mixed with APCs at 1:3 ratios. APCs were obtained by FACS sorting and were negative for CD8, CD4, and NK1.1 markers. Cultures were supplemented with anti-IFN- γ and anti-IL-4 (both at 10 μ g/ml; eBioscience). IL-27, IL-6 and p28/CLF were used at 50 ng/ml. Proliferation was assessed by flow cytometry at day 3.

Results

The IL-27 p28 subunit and CLF form a secreted complex

To study whether p28 can be secreted as a complex with CLF, we generated HEK-293 transfectants expressing epitope-tagged derivatives of p28 and CLF alone or in combination. GFP cDNA transfectants were used as a control. The culture medium were subjected to immunoprecipitation with tag-specific mAbs and the isolated fractions were analyzed by Western blot. When culture medium from transfectants coexpressing epitope-tagged derivatives of human p28 (p28-protC) and CLF (CLF-FLAG) were immunoprecipitated with beads coupled to an anti-protein C mAb (recognizing the p28 tag) and the purified fractions assayed by Western blot, the CLF-FLAG protein was reproducibly detected (Fig. 1A). This result indicated the presence of a p28/CLF complex in the cotransfectant cell culture supernatants. The p28/CLF complex could also be detected using beads coupled to anti-FLAG mAb followed by revelation using the anti-protein C mAb (Fig. 1A).

Secretion of p28 was observed in HEK-293 cells transfected with p28 cDNA in the absence of CLF cDNA (Fig. 1A upper panel). This could indicate that formation of a complex with a soluble cytokine receptor is not strictly required for p28 secretion in these cells. In line with this observation, secretion of p28 in the absence of EBI3 was reported (1). Alternatively, it could reflect the formation of a complex between p28 and endogenous CLF as HEK-293 can express CLF (23).

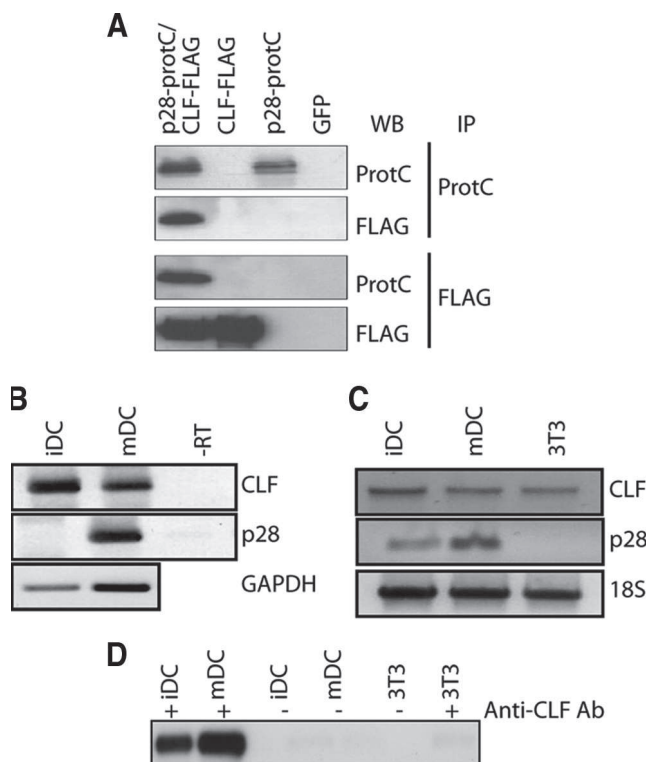


FIGURE 1. CLF forms a complex with the IL-27 p28 subunit. **A**, Human p28-protC alone, the CLF-FLAG/p28-protC complex, and CLF-FLAG alone or a GFP control were immunoprecipitated with beads coupled to anti-protein C or anti-FLAG mAbs. Proteins were revealed by Western blot using mAbs specific for the indicated epitope tags. WB, Western blot; IP, immunoprecipitation. **B** and **C**, Human monocyte (**B**)-derived and mouse BM-derived DC (**C**) were left unstimulated (iDC) or stimulated (mDC) with LPS (20 ng/ml or 1 μ g/ml, respectively). RNA was isolated at 48 h (human DC) or 18 h (mouse DC). Expression of p28 and CLF mRNA was assessed by RT-PCR. The control without reverse transcriptase is indicated as “-RT”. **D**, BM-derived DC were left unstimulated (iDC) or stimulated for 18 h with LPS (mDC). After lysis, the p28/CLF complex was immunoprecipitated with anti-CLF Ab (lanes +) or isotype control (lanes -) and analyzed by Western blot with anti-p28 mAb. Mouse 3T3 fibroblasts were used as negative control.

The p28/CLF complex is produced by DC

As experiments with HEK-293 transfectants indicated that p28 and CLF can be secreted as a complex, we investigated whether p28/CLF could be produced by immune cells. Activated APCs, such as DC express p28 mRNA (1, 28). As expected (1), LPS-induced DC maturation up-regulated p28 mRNA levels in both human and mouse DC (Fig. 1, **B** and **C**). We analyzed human and mouse DC for concomitant CLF mRNA expression. We observed that DC constitutively express CLF mRNA (Fig. 1, **B** and **C**). No p28 was detected in 3T3 fibroblasts used as a negative control (Fig. 1C). Together, these data indicate that activated DC have the potential to produce the p28/CLF complex.

We next investigated whether p28 and CLF form a complex in DC. As the commercial anti-mouse p28 mAb suitable for Western blot analysis was more sensitive than the anti-human p28 (supplementary Fig. S1A⁵ and data not shown), experiments were performed with mouse BM-derived DC. When immature or mature DC were lysed and subjected to immunoprecipitation with an anti-CLF Ab, a p28 signal was detected by Western blot in the purified

⁵ The online version of this manuscript contains supplemental material.

fractions (Fig. 1D). No signal was detected in lysates from p28-negative 3T3 cells used as a control. These data indicate that CLF and p28 can form a complex in primary DC.

The p28/CLF complex stimulates human NK cells

The observation that DC produce the p28/CLF complex (Fig. 1D) prompted us to test whether p28/CLF was biologically active. As NK cells respond to DC signals (29) and are activated by IL-27 (1), we tested whether p28/CLF could affect NK cell function. NK cells are negative for EBI3 mRNA even after activation, allowing us to exclude a contribution of EBI3 secreted by target cells (1).

Highly purified human NK cells were incubated with human p28/CLF alone or in combination with IL-2 or IL-12. The production of IFN- γ was measured by ELISA. Incubation with p28/CLF up-regulated IFN- γ production by NK cells stimulated with suboptimal concentrations of IL-2 or IL-12 in a dose-dependent manner (Fig. 2, A and B). We analyzed the effect of p28/CLF on the expression of the NK cell activation markers CD54 and CD69. Expression of both CD54 and CD69 was up-regulated by p28/CLF in NK cells stimulated with IL-2 or IL-12 (Fig. 2C). Incubation with p28/CLF did not modulate NK cell proliferation, perforin/granzyme B expression, and cytotoxic activity on K562 target cells (Fig. 2D and data not shown).

Together, these observations indicate that p28/CLF is biologically active: it increases IFN- γ production by activated NK cells.

The p28/CLF complex activates cells expressing IL-6R and IL-27R

IL-27R is made up of gp130 and WSX-1 (2). WSX-1 alone is sufficient for IL-27 binding (1). The formation of a complex between p28 and EBI3 is required for receptor recognition, as neither p28 nor EBI3 alone bind to IL-27R (2). We examined whether CLF could substitute for EBI3 in forming an alternative complex activating IL-27R. Experiments with mouse HEK-293 transfectants expressing WSX-1 indicated that p28/CLF binds WSX-1 and that the binding could be prevented by competition with IL-27, suggesting that WSX-1 was involved in the p28/CLF receptor (supplementary Fig. S1B). We next used the IL-3-dependent mouse pro-B cell line Ba/F3 to study functional responses to p28/CLF. Ba/F3 cells can be rendered responsive to cytokines by transfection with receptor chain cDNAs and have been used to characterize both the IL-27R and CLC/CLF receptors (1, 2, 22). Ba/F3 cells express endogenous WSX-1 and can be rendered IL-27 responsive by introducing gp130 cDNA (2). We transfected Ba/F3 cells with mouse gp130 cDNA and tested the effect of purified p28/CLF on STAT1 and STAT3 phosphorylation. Incubation of Ba/F3-gp130 transfectants with p28/CLF led to a detectable induction of STAT3 phosphorylation but no STAT1 activation, suggesting that p28/CLF receptor activation was incomplete in these cells (Fig. 3A, left panels). The Ba/F3-gp130 cells responded robustly to both mouse IL-27 and the gp130 ligand hyper-IL-6 (25), indicating that the lack of response was not due to insufficient expression of WSX-1 or gp130 (supplemental Fig. S2A and Fig. 3A).

IL-6 family members like p28 have three potential receptor binding sites (30, 31). According to the current IL-27/IL-27R complex model, p28 binds EBI3 through site I, WSX-1 through site II, while gp130 recruitment is mediated by site III (30). EBI3 functions as a soluble α -chain, required for receptor recognition and activation (2, 30). Whereas CLF was initially considered a soluble α -chain, it does not play this role in the CLC/CLF complex which requires the nonsignaling CNTFR α chain in addition to two signal-transducing subunits for functional responses (22). Mutagenesis analysis indicated that, whereas CNTFR α binds CLC site I (the

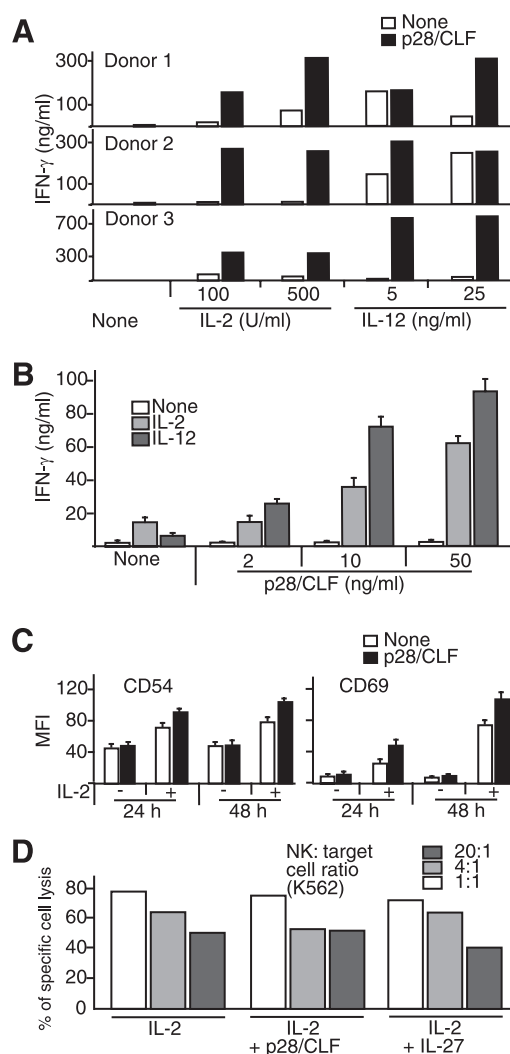


FIGURE 2. The p28/CLF complex enhances NK cell activation. **A**, NK cells purified from three independent donors were stimulated with the indicated concentrations of IL-2 or IL-12 in the presence or absence of purified p28/CLF (100 ng/ml) for 48 h and IFN- γ production was measured by ELISA. **B**, Purified NK cells were incubated for 48 h with medium alone, IL-2 (100 U/ml), or IL-12 (5 ng/ml) and various concentrations of p28/CLF (2–50 ng/ml). Errors bars indicate the SEM of triplicate cultures. **C**, NK cells were incubated for 24 or 48 h with medium alone, IL-2 (100 U/ml), p28/CLF (100 ng/ml), or a combination of the two cytokines. Expression of CD54 and CD69 was assessed by flow cytometry. **D**, NK cells stimulated with IL-2 (100 U/ml), IL-2 and p28/CLF (100 ng/ml), or IL-2 and IL-27 (100 ng/ml) for 48 h were incubated for 4 h at 37°C with K562 target cells at the indicated E:T ratios and the fraction of specific lysis was determined. Errors bars indicate the SEM of triplicate cultures.

site interacting with α -chains in the IL-6 family (31)), CLF binds the CLC site III (32). Therefore, if p28/CLF is structurally similar to CLC/CLF, its receptor requires an α -chain in addition to WSX-1 and gp130. To investigate this hypothesis, we introduced cDNAs encoding mouse IL-6R α or IL-11R α into gp130-transfected Ba/F3 cells. These transfectants express functional receptors for either IL-27 and IL-6 (i.e., WSX-1, gp130, and IL-6R α) or IL-27 and IL-11 (i.e., WSX-1, gp130, and IL-11R α). As expected, introduction of IL-6R α or IL-11R α rendered the Ba/F3-gp130 cells responsive to IL-6 or IL-11, respectively, when analyzed for STAT1 and STAT3 phosphorylation (Fig. 3A). Strikingly, introduction of the IL-6R α chain strongly increased p28/CLF-induced STAT3 phosphorylation (Fig. 3A). In the presence of IL-6R α , STAT1

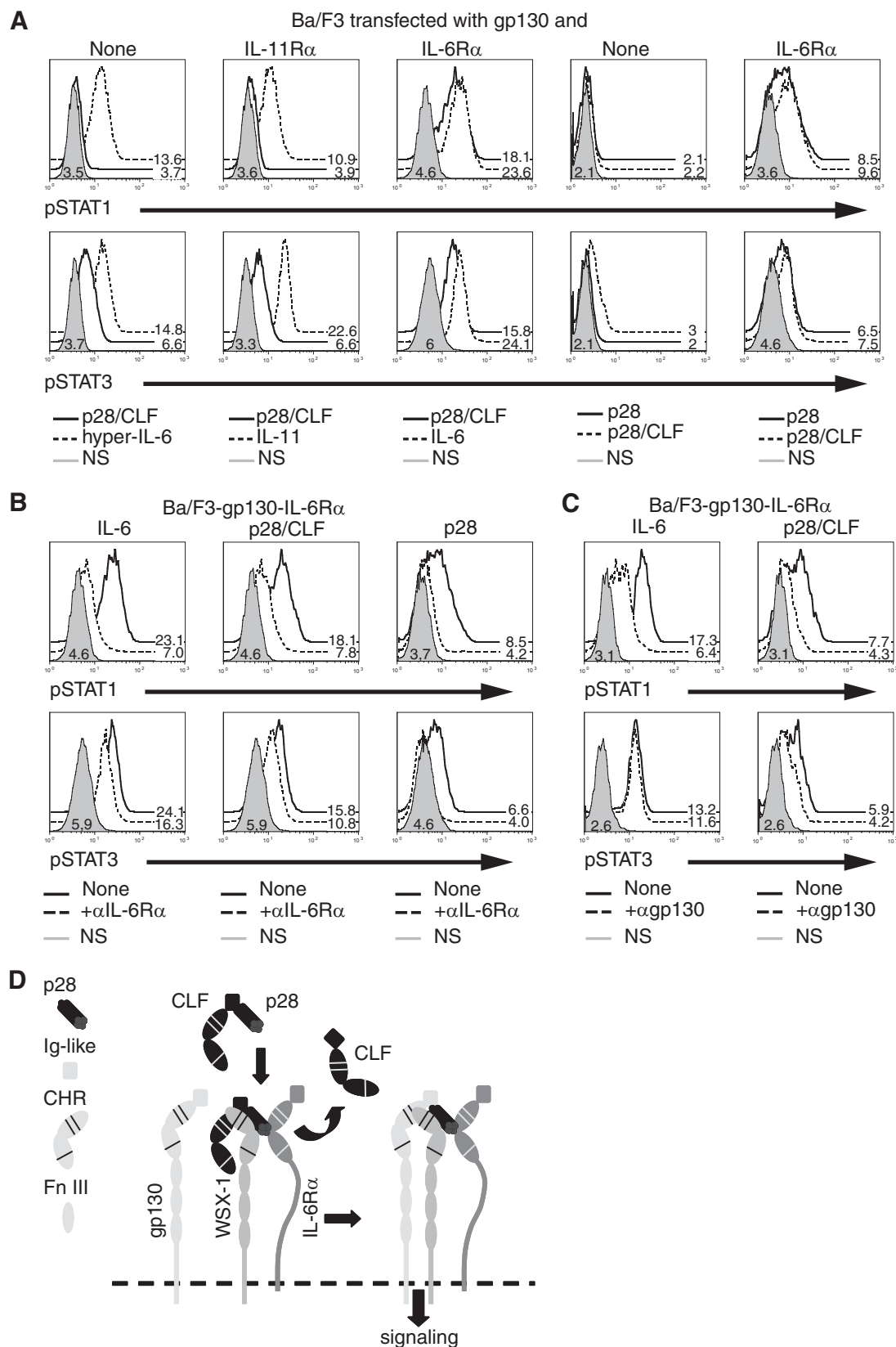
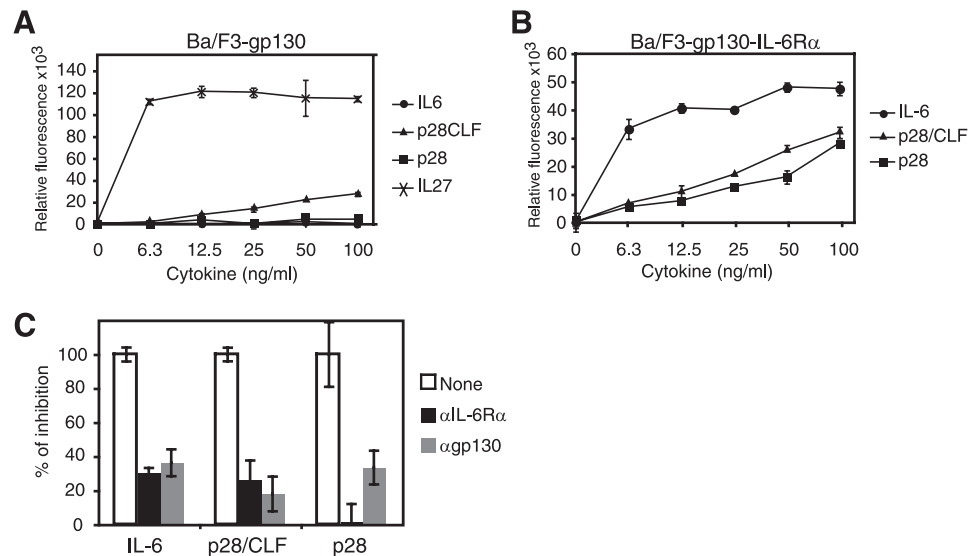


FIGURE 3. Both p28 and the p28/CLF complex induce STAT1 and STAT3 phosphorylation in Ba/F3 cells transfected with gp130 and IL-6R α . **A**, Ba/F3 transfectants expressing endogenous WSX-1 in combination with either gp130, gp130, and IL-11R α or gp130 and IL-6R α were stimulated with the cytokines indicated for 15 min, then fixed and permeabilized. STAT phosphorylation was assessed by flow cytometry. **B** and **C**, Ba/F3-IL-6R cells were preincubated with blocking anti-IL-6R α mAb (0.5 μ g/ml; **B**) or anti-gp130 mAb (1 μ g/ml; **C**) before stimulation. MFI values are indicated in the histograms. Data are representative of three independent experiments. **D**, Representation of the putative p28/CLF receptor based on the current models of the IL-27-IL-27R and CLC/CLF-CNTFR complexes (2, 30, 32). According to this model, the CLF Ig-like domain would engage the p28 binding site III. The p28/CLF complex would bind IL-6R α and WSX-1 through cytokine-binding homology regions (CHR)-p28 site I and site II interactions, respectively. Recruitment of the gp130 subunit would require an exchange between the Ig-like domains of CLF and gp130. Fn III, Fibronectin III domains.

FIGURE 4. Both p28 and the p28/CLF complex induce the proliferation of Ba/F3 transfected with gp130 and IL-6R α . *A* and *B*, Transfectants expressing endogenous WSX-1 in combination with gp130 (Ba/F3-gp130) or gp130 and IL-6R α (Ba/F3-gp130-IL-6R α) were incubated with the cytokines indicated for 72 h and proliferation was measured by fluorescence using the Alamar blue test. *C*, Ba/F3-gp130-IL-6R α transfectants were incubated with IL-6 (50 ng/ml), p28/CLF (50 ng/ml), or p28 (50 ng/ml) and the indicated blocking mAbs. Errors bars indicate the SEM of triplicate cultures.



phosphorylation was comparable to the one induced by IL-6 (Fig. 3A). The effect of IL-6R α cDNA transfection was specific, as no difference in the response induced by p28/CLF was observed between Ba/F3 transfected with gp130 alone or with gp130 plus IL-11R α (Fig. 3A). These results suggest that the receptor for p28/CLF is tripartite and that the α -chain required for functional activity is IL-6R α (Fig. 3D). In accordance with this model, we could detect p28/CLF binding on HEK-293 transfectants expressing mouse IL-6R α (supplemental Fig. S1C).

To further assess the involvement of IL-6R α and gp130 in the p28/CLF receptor complex, we preincubated Ba/F3-gp130-IL-6R α cells with blocking Abs specific for these two receptor chains (Fig. 3, *B* and *C*). Incubation with either anti-IL-6R α (Fig. 3B) or anti-gp130 (Fig. 3C) Abs resulted in a clearly decreased level of STAT3 and STAT1 phosphorylation in response to p28/CLF, confirming the contributions of these two chains. No inhibition was observed when Ba/F3-gp130-IL-6R α cells were stimulated with IL-27 in the presence of an anti-IL-6R α Ab, indicating that the effect observed was specific for p28/CLF (supplemental Fig. S2B). The involvement of WSX-1 could not be directly tested due to the lack of availability of suitable anti-WSX-1 Abs and the inefficiency of soluble mouse WSX-1-Fc in blocking IL-27-induced responses in Ba/F3 cells transfected with gp130 at the concentrations of IL-27 required to induce a detectable STAT3 and STAT1 phosphorylation or cellular proliferation (data not shown). Together, these results indicate that p28/CLF can activate JAK/STAT signaling pathways in cells expressing IL-6R α , gp130, and WSX-1. A putative model of the p28/CLF receptor is depicted in Fig. 3D.

To study the functionality of the STAT signaling in response to p28/CLF in the Ba/F3 transfectants, we measured cell proliferation. A clear proliferation was observed when Ba/F3 cells transfected with gp130 and IL-6R α were incubated with p28/CLF (Fig. 4B). This proliferation could be inhibited by blocking anti-IL-6R α or anti-gp130 Abs (Fig. 4C). The blocking Abs had no effect on IL-3-induced Ba/F3 proliferation, indicating that the effect on the p28/CLF was specific (data not shown). Whereas Ba/F3-gp130 cells proliferated strongly when cultured with IL-27, their proliferation in response to p28/CLF was very limited (Fig. 4A). As expected, almost no proliferation was induced by p28/CLF in Ba/F3-gp130-IL-11R α cells (data not shown). This indicates that the STAT3 phosphorylation induced by the p28/CLF complex in the absence of IL-6R α (Fig. 3A) triggers minimal proliferation and

that the STAT3 and STAT1 phosphorylation induced in Ba/F3 transfectants expressing WSX-1, gp130, and IL-6R α is followed by a robust proliferation.

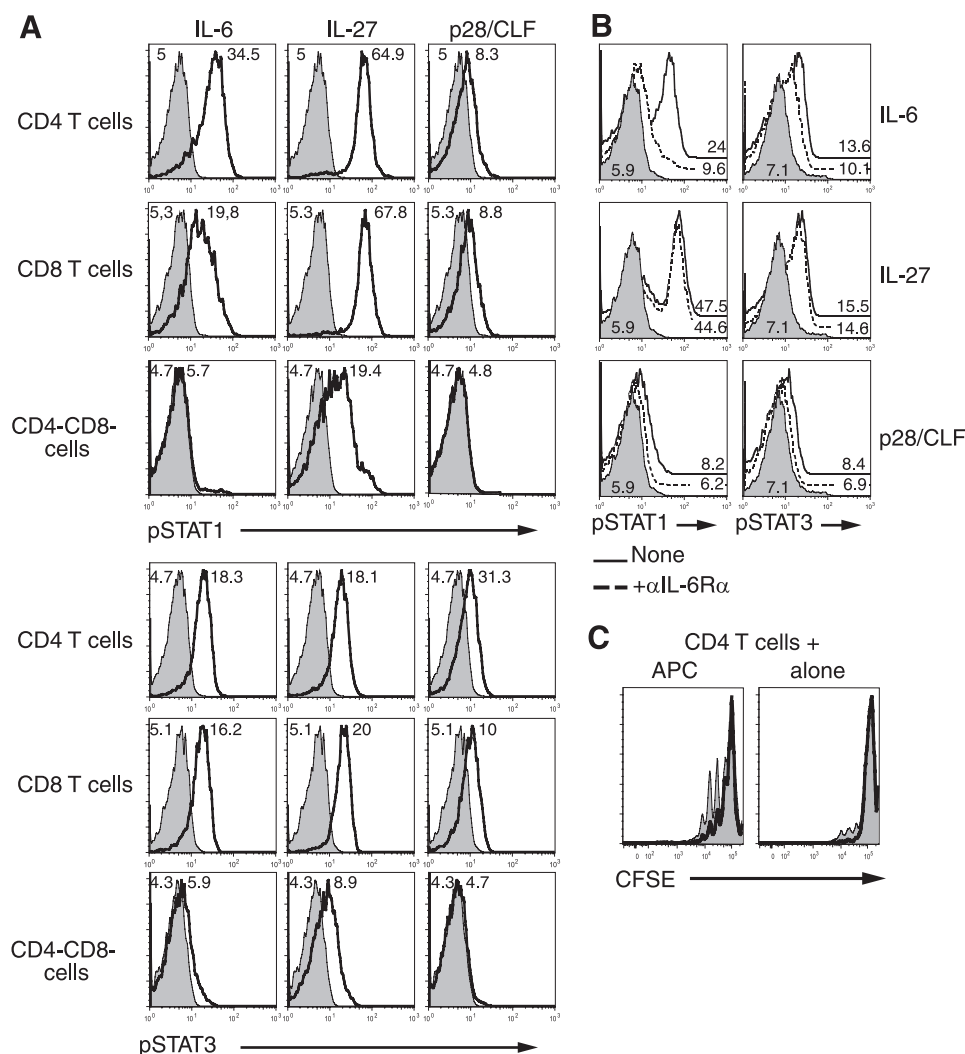
CLF is not required for the activation of cells expressing IL-6R α

In the case of CLC/CLF, CLF is required for CLC secretion but is dispensable for CNTFR activation (22). It was previously reported that p28 is biologically active (11). We therefore compared p28 and p28/CLF using Ba/F3 transfectants expressing IL-27R or IL-27R plus IL-6R α . Interestingly, unlike p28/CLF, p28 neither induced detectable STAT3 or STAT1 phosphorylation nor proliferation in Ba/F3 transfectants expressing IL-27R (Figs. 3A and 4A). This indicates that CLF is involved in the activation leading to low-level STAT3 phosphorylation in the absence of IL-6R α (Fig. 3A). In Ba/F3-gp130-IL-6R α cells (expressing IL-27R and IL-6R α), p28 induced STAT1 and STAT3 phosphorylation followed by a proliferation comparable to that induced by the p28/CLF complex (Figs. 3A and 4B). STAT activation and proliferation could be inhibited using blocking anti-IL-6R α and anti-gp130 Abs (Figs. 3B and 4C). These results indicate that although p28 and p28/CLF have comparable activities on transfectants expressing WSX-1, gp130, and IL-6R α , p28/CLF might have additional functions linked to its ability to induce STAT3 activation in cells expressing only IL-27R.

The p28/CLF complex induces STAT1 and STAT3 phosphorylation in CD4 and CD8 T cells and cytokine production in CD4 T cells

To evaluate whether p28/CLF could induce signaling in T cells, we assessed the effect of p28/CLF stimulation on STAT1 and STAT3 phosphorylation in lymph node cells. Stimulation with p28/CLF induced an increase in STAT1 and STAT3 phosphorylation in both CD8 and CD4 T cells (Fig. 5A). Interestingly, no effect could be detected on the cells negative for CD4 or CD8 (Fig. 5A). This suggests that the requirement for the IL-6R α chain may render p28/CLF more specific for T cells than IL-27. To verify that the IL-6R α chain was required for p28/CLF activity on T cells, we preincubated lymph node cells with an anti-IL-6R α mAb (Fig. 5B). The blocking mAb markedly reduced the response induced by IL-6 or p28/CLF (Fig. 5B). As expected, no effect was observed on the induction of STAT1 and STAT3 phosphorylation by IL-27

FIGURE 5. The p28/CLF complex induces IL-6 α -dependent STAT1 and STAT3 phosphorylation and proliferation in T cells. **A**, Lymph node cells were stimulated with 50 ng/ml of the cytokines indicated for 15 min, fixed, permeabilized, and stained with anti-CD4, anti-CD8, and either anti-pSTAT1 or anti-pSTAT3 mAbs. **B**, Lymph node cells were preincubated with (dashed line) or without (bold line) blocking anti-IL-6 α mAb (0.5 μ g/ml) before cytokine stimulation. MFI values are indicated in the histograms. Filled gray histograms, Unstimulated cells. **C**, CFSE dilution analysis of CD4 T cells activated with anti-CD3 and anti-CD28 in the presence (left panel) or absence of APCs (right panel) for 3 days. For CFSE fluorescence analysis, cultures were restained with Alexa Fluor 700-labeled anti-CD4 mAb and plots were gated on CD4⁺ cells. Filled gray histograms, Control cells. Open histograms, Cells incubated with p28/CLF (50 ng/ml). Data are representative of three independent experiments.



(Fig. 5B). This indicates that IL-6 α constitutes an essential part of the p28/CLF receptor in primary immune cells.

The levels of STAT1 and STAT3 phosphorylation in T cells were lower than those observed following IL-27 stimulation. However, the rIL-27 used might have a higher potency than native IL-27 because it is a fusion protein structurally analogous to hyper-IL-6, which is two orders of magnitude more potent than the IL-6-soluble IL-6 α complex (25).

Because p28/CLF induced STAT signaling in CD4 T cells, we investigated whether p28/CLF had a functional effect on these cells. Purified CD4 T cells stained with CFSE were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 in the presence or absence of APCs and proliferation was assessed by flow cytometry (Fig. 5C). Under both culture conditions, CD4 T cell proliferation was inhibited by p28/CLF. Growth inhibition was stronger in the absence of APCs, indicating a direct effect of p28/CLF on CD4 T cells. We next investigated whether the inhibition of CD4 T cell proliferation was paralleled by an effect on differentiation. Since Th17 differentiation has been shown to be induced by IL-6 plus TGF- β and inhibited by IL-27 (10, 11, 33–35), we assessed IL-17 and IFN- γ expression in CD4 T cells expanded with anti-CD3 and anti-CD28 in the presence of p28/CLF and TGF- β . When cells were activated in the presence of p28/CLF and TGF- β or IL-6 and TGF- β and subsequently restimulated with ionomycin and PMA, the fraction of cells expressing IL-17 was comparable (Fig. 6A). This indicates that p28/CLF, like IL-6, can drive Th17 differentiation in vitro

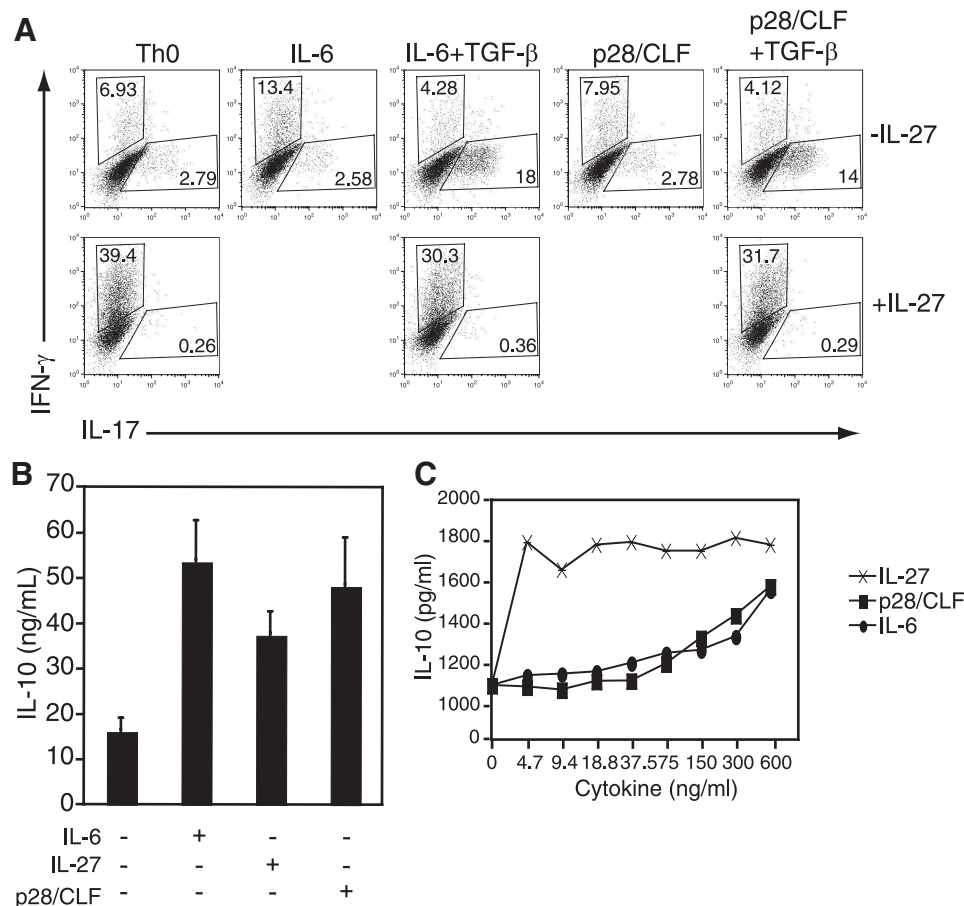
(Fig. 6A). Interestingly, both IL-6- and p28/CLF-driven Th17 differentiation was suppressed by IL-27 (Fig. 6A, lower panels).

Both IL-27 and IL-6 have been shown to induce the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (15–17). This production is involved in the beneficial effect of IL-27 administration in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis (16). We therefore investigated whether p28/CLF could also induce IL-10 production by activated CD4 T cells (Fig. 6B). When tested on purified CD4 T cells, p28/CLF, IL-6, and IL-27 induced similar peak levels of IL-10 (Fig. 6B). We compared the potency of p28/CLF, IL-6, and IL-27 in inducing IL-10 production. When tested on splenocytes, the potency of p28/CLF was similar to that of IL-6 but markedly lower than that of IL-27 (Fig. 6C).

Discussion

The difference between the phenotype of *EBI3*^{-/-} and *WSX-1*^{-/-} mice suggests that WSX-1 has additional ligands or that p28 forms complexes capable of activating IL-27R with alternative cytokine receptors (5, 19–21). We observed that tagged derivatives of p28 and CLF coexpressed in HEK-293 transfectants form a stable, secreted complex. As activated APCs have been shown to synthesize IL-27 p28 (1, 28, 36), we used mouse BM-derived DC to show that a p28/CLF complex could also be formed between the endogenous cytokine and the soluble cytokine receptor.

FIGURE 6. The p28/CLF complex modulates CD4 T cell differentiation and IL-10 secretion. **A**, Cells were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 in the presence of the indicated cytokines with (lower panels) or without (upper panels) IL-27 (50 ng/ml) for 4 days. The cell culture medium comprised a combination of blocking anti-IL-4 and anti-IFN- γ Abs. Cells were restimulated with ionomycin and PMA (4 h), fixed, permeabilized, stained with anti-CD4, anti-IFN- γ , and anti-IL-17, and analyzed by flow cytometry. Brefeldin A was added for the last 2 h. IL-6, TGF- β , and p28/CLF were used at 10, 1, and 50 ng/ml, respectively. MFI values are indicated in the histograms. Data are representative of three independent experiments. **B**, CD4 T cells were activated with either IL-6 (33 ng/ml), IL-27 (33 ng/ml), or p28/CLF (33 ng/ml) as indicated. IL-10 levels were measured by ELISA at day 4. Errors bars indicate the SEM of triplicate cultures. Data are representative of two independent experiments. **C**, Splenocytes were incubated with the indicated concentrations of IL-27, p28/CLF, or IL-6. IL-10 secretion was assessed by ELISA. Data are representative of three independent experiments.



We examined whether CLF could substitute for EBI3 in forming an alternative complex activating IL-27R. To investigate the activation of cells expressing IL-27R by p28/CLF, we used the mouse pro-B cell line Ba/F3. This cell line expresses WSX-1 and can be rendered IL-27 responsive by solely introducing gp130 cDNA (2). Ba/F3 transfected with gp130 showed a partial response to p28/CLF: incubation with the complex led to STAT3 phosphorylation but was insufficient to induce STAT1 activation and resulted in minimal cell proliferation, suggesting that the receptor required an additional chain. In accordance with this hypothesis, p28/CLF binds to HEK-293 transfectants expressing IL-6R α . Introduction of IL-6R α and gp130 cDNAs to generate Ba/F3 cells expressing IL-27R and IL-6R α led to transfectants responding to p28/CLF by STAT1 and STAT3 phosphorylation and proliferation. This response could be blocked using anti-IL-6R α or anti-gp130 Ab. This indicates that p28/CLF can engage the two receptor chains of IL-6. It has already been shown that IL-6R α binds CNTF and can substitute for CNTFR α in the CNTFR (37). Therefore, these results bring to three the number of IL-6R α ligands. We observed that p28/CLF binds to WSX-1 transfectants. This suggests that, in contrast to IL-6, the p28/CLF receptor is tripartite and comprises, besides gp130 and IL-6R α , WSX-1 (Fig. 3D). However, the implication of this IL-27R signaling chain remains to be directly established using cells from WSX-1 knockout mice. An alternative model in which p28/CLF would signal by recruiting two gp130 chains cannot be excluded.

In the CLC/CLF complex, CLF is required for CLC secretion but dispensable for cytokine activity (22, 38). Furthermore, it was reported that p28 is biologically active (11). We therefore compared p28 and p28/CLF activities using Ba/F3 cells transfected with gp130 or gp130 plus IL-6R α . The activity of p28 and p28/

CLF was indistinguishable in transfectants expressing IL-27R and IL-6R α , indicating that, like in the CLC/CLF complex, CLF is not required for receptor recognition (22, 39). However, unlike p28, p28/CLF induced a STAT3 phosphorylation in transfectants expressing only IL-27R. We confirmed this observation using HEK-293 cells transfected with gp130 and WSX-1 (data not shown). These observations suggest that in cells expressing IL-27R but not IL-6R α , CLF could confer specific properties to p28. These p28/CLF-specific effects are likely related to those induced by IL-6 family members activating preferentially STAT3, such as IL-6 (40). The mechanism by which CLF is modifying p28 activity remains to be determined. CLF could potentially increase the affinity of p28 for the WSX-1/gp130 receptor signaling chains in the absence of the IL-6R α chain.

The observation that the p28/CLF complex could be detected in DC prompted us to evaluate whether the composite cytokine could act on NK cells. The function of these cells is known to be modulated by DC in vitro and in vivo (41–46). NK cells respond to IL-27 and do not express EBI3 (2). This excludes the neo formation of an IL-27 complex comprising the p28 subunit of p28/CLF and EBI3 released by target cells. Whereas no p28/CLF-induced response was detected in unstimulated human NK cells, reproducible up-regulation of IL-2- or IL-12-induced production of IFN- γ was observed. Coincubation of NK cells with p28/CLF led to increased expression of the activation markers CD54 and CD69. p28/CLF did not modulate the NK cell cytotoxic activities assessed by measuring the killing of the cell line K562. These observations suggest that the perforin/granzyme B-based pathway, which has been reported to be the main pathway mediating K562 cytotoxicity (47), is not affected by the composite cytokine.

The increase in IFN- γ production detected indicates that the production of one of the key NK cell-DC cross-talk mediator is regulated by p28/CLF. The observation that NK cell activation and IFN- γ production is up-regulated by p28/CLF (whereas cytotoxic activity is not affected) is in line with previous reports analyzing the effects of DC-produced cytokines on NK cells, indicating that the regulation of cytotoxicity is mediated by type I IFNs, whereas production of IFN- γ is regulated by cytokines such as IL-12 and IL-18 (42, 48).

The role of cytokines produced by DC in the activation of NK cells is well established (42, 44, 45, 49, 50). This comprises secreted composite cytokines of the IL-12/IL-27 family and cytokine complexes expressed at the surface of the DC such as the IL-15/IL-15R α chain complex (1, 48, 50–53). Our results indicate that p28/CLF could, in combination with the structurally related IL-12 or with IL-2, participate in the cross-talk between DC and NK cells. NK cells are important components of the innate immune response and, through their production of cytokines and lytic activity against infected or transformed cells, are crucial for both controlling infection and immune surveillance (51, 54).

IL-27 has key anti-inflammatory roles in different models of infection and autoimmune disease, inhibiting Th17 differentiation and promoting the induction of the anti-inflammatory cytokine IL-10 by CD4 and CD8 T cells (10, 11, 15, 16, 18). IL-27 directly antagonizes the effect of IL-6 on CD4 T cell proliferation and Th17 differentiation, whereas both cytokines have similar activities regarding induction of IL-10 production by T cells (10, 11, 15, 16). IL-27 induces activation of multiple STATs in T cells (2, 6, 55, 56). The anti-inflammatory effects of IL-27 on T cells linked to either the inhibition of IL-2 production, Th17 differentiation, or the induction of IL-10 production have been shown to be mediated by STAT1 and STAT3 (10, 11, 13, 16, 17). We therefore evaluated whether p28/CLF activates STAT1 and STAT3 in T cells (57). Stimulation with p28/CLF induced STAT1 and STAT3 phosphorylation in lymph node cells expressing either CD4 or CD8, whereas no effect could be detected on cells negative for these markers. As the cells negative for CD4 and CD8 were barely responsive to IL-6 and markedly less responsive to IL-27 than the CD4- or CD8-positive cells, this observation is likely to reflect a higher threshold of activation of the non-T cell populations present in the cultures by this group of cytokines under the experimental conditions used. This could be the result of a lower expression of components of the receptor, of the JAK/STAT signaling pathway, or an increased steady-state activation of JAK/STAT- negative regulators. We could verify using a blocking Ab that the IL-6R α chain was required for p28/CLF-induced T cell activation.

We investigated whether the induction of STAT phosphorylation was paralleled by functional effects on CD4 T cells. We observed that p28/CLF inhibited the anti-CD3 plus anti-CD28-induced proliferation of CD4 T cells in the presence or absence of APCs, further indicating a direct effect of the complex on CD4 T cells. Interestingly, p28/CLF in combination with TGF- β induced the differentiation of CD4 T cells capable of producing IL-17 to a similar level than that of IL-6 plus TGF- β and this effect could be completely prevented by the addition of IL-27. The marked difference between the effects of IL-27 and those of p28/CLF under these culture conditions suggests that the type of α -chain involved (i.e., IL-6R α or EBI3) in the receptor complex changes the nature of the signal induced in the activated T cells. Marked differences between the responses induced by cytokines engaging different receptor α -chains but recruiting the same signaling chains have been reported previously (58). These results show that p28 and p28/CLF can have regulatory effects which

differ from IL-27 regarding the production of IL-17, a cytokine which plays a pivotal role in several autoimmune diseases (59, 60).

Both IL-6 and IL-27 induce the production of IL-10 by T cells (10, 11, 15, 16). These cytokines play an important role in the control of inflammation and autoimmunity (61–64). We observed that the addition of p28/CLF to CD4 T cell cultures induced levels of IL-10 comparable to those induced by IL-6 or IL-27, indicating that p28/CLF could, like IL-27, have immunosuppressive effects through the induction of IL-10 production (15–17).

The initial characterization of p28/CLF using NK and T cells indicates that it could share functions with both IL-27 and IL-6. IL-6 is a key pleiotropic proinflammatory cytokine which drives the transition from the early innate immune response (involving neutrophil recruitment) to the mononuclear leukocyte-mediated adaptive immune response, promoting both humoral and cellular reactions (40). IL-27 is believed to be required for the resolution of adaptive responses and the prevention of chronic inflammation (4–12). A comparison between the phenotypes of mice deficient for IL-6 and IL-6R α would provide information as to the roles of alternative IL-6R α ligands such as p28/CLF in vivo.

Blocking IL-6R α with mAbs is a promising therapeutic avenue that has been extensively investigated in preclinical models of inflammatory and autoimmune diseases (40, 65, 66). It led to the development of humanized blocking Abs such as tocilizumab (67). Tocilizumab has been tested in clinical trials for the treatment of Castelman's disease (68), rheumatoid arthritis (69–71), juvenile idiopathic arthritis (72), and Crohn's disease (73). It has been approved by Japanese and European regulatory agencies and is currently being reviewed by the U.S. Food and Drug Administration (74, 75). The observation that IL-6R α is also engaged by p28/CLF may therefore have important implications for the full understanding of the mode of action of tocilizumab and for precise comparisons with other IL-6 inhibitors such as soluble gp130 derivatives (66, 76–78).

Acknowledgments

We are grateful to Dr. K. Fukudome (Saga Medical School, Saga, Japan) for the gift of Ba/F3 cells. We thank S. Sénechal (Université de Montreal, Montreal, Canada) and D. Gagné (Institute for Research in Immunology and Cancer, Montreal) for help with flow cytometry.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Pflanz, S., J. C. Timans, J. Cheung, R. Rosales, H. Kanzler, J. Gilbert, L. Hibbert, T. Churakova, M. Travis, E. Vaisberg, W. M. Blumenschein, et al. 2002. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4⁺ T cells. *Immunity* 16: 779–790.
- Pflanz, S., L. Hibbert, J. Mattson, R. Rosales, E. Vaisberg, J. F. Bazan, J. H. Phillips, T. K. McClanahan, R. de Waal Malefyt, and R. A. Kastelein. 2004. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J. Immunol.* 172: 2225–2231.
- Yoshimoto, T., K. Okada, N. Morishima, S. Kamiya, T. Owaki, M. Asakawa, Y. Iwakura, F. Fukai, and J. Mizuguchi. 2004. Induction of IgG2a class switching in B cells by IL-27. *J. Immunol.* 173: 2479–2485.
- Chen, Q., N. Ghilardi, H. Wang, T. Baker, M. H. Xie, A. Gurney, I. S. Grewal, and F. J. de Sauvage. 2000. Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature* 407: 916–920.
- Yoshida, H., S. Hamano, G. Senaldi, T. Covey, R. Faggioni, S. Mu, M. Xia, A. C. Wakeham, H. Nishina, J. Potter, C. J. Saris, and T. W. Mak. 2001. WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to *L. major* infection. *Immunity* 15: 569–578.
- Villarino, A., L. Hibbert, L. Lieberman, E. Wilson, T. Mak, H. Yoshida, R. A. Kastelein, C. Saris, and C. A. Hunter. 2003. The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity* 19: 645–655.
- Artis, D., A. Villarino, M. Silverman, W. He, E. M. Thornton, S. Mu, S. Summer, T. M. Covey, E. Huang, H. Yoshida, et al. 2004. The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. *J. Immunol.* 173: 5626–5634.
- Hamano, S., K. Himeno, Y. Miyazaki, K. Ishii, A. Yamanaka, A. Takeda, M. Zhang, H. Hisaeda, T. W. Mak, A. Yoshimura, and H. Yoshida. 2003. WSX-1

- is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity* 19: 657–667.
9. Rosas, L. E., A. A. Satskar, K. M. Roth, T. L. Keiser, J. Barbi, C. Hunter, F. J. de Sauvage, and A. R. Satskar. 2006. Interleukin-27R (WSX-1/T-cell cytokine receptor) gene-deficient mice display enhanced resistance to *Leishmania donovani* infection but develop severe liver immunopathology. *Am. J. Pathol.* 168: 158–169.
 10. Batten, M., J. Li, S. Yi, N. M. Kijavini, D. M. Danilenko, S. Lucas, J. Lee, F. J. de Sauvage, and N. Ghilardi. 2006. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat. Immunol.* 7: 929–936.
 11. Stumhofer, J. S., A. Laurence, E. H. Wilson, E. Huang, C. M. Tato, L. M. Johnson, A. V. Villarino, Q. Huang, A. Yoshimura, D. Sehly, et al. 2006. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat. Immunol.* 7: 937–945.
 12. Pearl, J. E., S. A. Khader, A. Solache, L. Gilmartin, N. Ghilardi, F. de Sauvage, and A. M. Cooper. 2004. IL-27 signaling compromises control of bacterial growth in mycobacteria-infected mice. *J. Immunol.* 173: 7490–7496.
 13. Owaki, T., M. Asakawa, S. Kamiya, K. Takeda, F. Fukai, J. Mizuguchi, and T. Yoshimoto. 2006. IL-27 suppresses CD28-mediated [correction of medicated] IL-2 production through suppressor of cytokine signaling 3. *J. Immunol.* 176: 2773–2780.
 14. Villarino, A. V., J. S. Stumhofer, C. J. Saris, R. A. Kastelein, F. J. de Sauvage, and C. A. Hunter. 2006. IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation. *J. Immunol.* 176: 237–247.
 15. Awasthi, A., Y. Carrier, J. P. Peron, E. Bettelli, M. Kamanaka, R. A. Flavell, V. K. Kuchroo, M. Oukka, and H. L. Weiner. 2007. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat. Immunol.* 8: 1380–1389.
 16. Fitzgerald, D. C., G. X. Zhang, M. El-Behi, Z. Fonseca-Kelly, H. Li, S. Yu, C. J. Saris, B. Gran, B. Ciric, and A. Rostami. 2007. Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat. Immunol.* 8: 1372–1379.
 17. Stumhofer, J. S., J. S. Silver, A. Laurence, P. M. Porrett, T. H. Harris, L. A. Turka, M. Ernst, C. J. Saris, J. J. O'Shea, and C. A. Hunter. 2007. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat. Immunol.* 8: 1363–1371.
 18. Fitzgerald, D. C., B. Ciric, T. Touil, H. Harle, J. Grammatikopoulou, J. Das Sarma, B. Gran, G. X. Zhang, and A. Rostami. 2007. Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 179: 3268–3275.
 19. Siebler, J., S. Wirtz, C. Frenzel, M. Schuchmann, A. W. Lohse, P. R. Galle, and M. F. Neurath. 2008. Cutting edge: a key pathogenic role of IL-27 in T cell-mediated hepatitis. *J. Immunol.* 180: 30–33.
 20. Yamanaka, A., S. Hamano, Y. Miyazaki, K. Ishii, A. Takeda, T. W. Mak, K. Himeno, A. Yoshimura, and H. Yoshida. 2004. Hyperproduction of proinflammatory cytokines by WSX-1-deficient NKT cells in concanavalin A-induced hepatitis. *J. Immunol.* 172: 3590–3596.
 21. Nieuwenhuis, E. E., M. F. Neurath, N. Corazza, H. Iijima, J. Trgovcich, S. Wirtz, J. Glickman, D. Bailey, M. Yoshida, P. R. Galle, et al. 2002. Disruption of T helper 2-immune responses in Epstein-Barr virus-induced gene 3-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 16951–16956.
 22. Elson, G. C., E. Lelievre, C. Guillet, S. Chevalier, H. Plun-Favreau, J. Froger, I. Suard, A. B. de Coignac, Y. Delneste, J. Y. Bonnefoy, et al. 2000. CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat. Neurosci.* 3: 867–872.
 23. Elson, G. C., P. Graber, C. Losberger, S. Herren, D. Gretener, L. N. Menoud, T. N. Wells, M. H. Kosco-Vilbois, and J. F. Gauchat. 1998. Cytokine-like factor-1, a novel soluble protein, shares homology with members of the cytokine type I receptor family. *J. Immunol.* 161: 1371–1379.
 24. Cognet, I., F. Guilhot, M. Gabriac, S. Chevalier, Y. Chouik, A. Herman-Bert, A. Guay-Giroux, S. Corneau, G. Magistrelli, G. C. Elson, H. Gascan, and J. F. Gauchat. 2005. Cardiotrophin-like cytokine labelling using Bir A biotin ligase: a sensitive tool to study receptor expression by immune and non-immune cells. *J. Immunol. Methods* 301: 53–65.
 25. Fischer, M., J. Goldschmidt, C. Peschel, J. P. Brakenhoff, K. J. Kallen, A. Wollmer, J. Grotzinger, and S. Rose-John. 1997. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat. Biotechnol.* 15: 142–145.
 26. Son, Y. I., S. Egawa, T. Tatsumi, R. E. Redlinger, Jr., P. Kalinski, and T. Kanto. 2002. A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells. *J. Immunol. Methods* 262: 145–157.
 27. Fuhlbrigge, R. C., S. M. Fine, E. R. Unanue, and D. D. Chaplin. 1988. Expression of membrane interleukin 1 by fibroblasts transfected with murine pro-interleukin 1 α cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5649–5653.
 28. Liu, J., X. Guan, and X. Ma. 2007. Regulation of IL-27 p28 gene expression in macrophages through MyD88- and interferon- γ -mediated pathways. *J. Exp. Med.* 204: 141–152.
 29. Zitvogel, L., M. Terme, C. Borg, and G. Trinchieri. 2006. Dendritic cell-NK cell cross-talk: regulation and physiopathology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 298: 157–174.
 30. Skiniotis, G., P. J. Lupardus, M. Martick, T. Walz, and K. C. Garcia. 2008. Structural organization of a full-length gp130/LIF-R cytokine receptor transmembrane complex. *Mol. Cell* 31: 737–748.
 31. Bravo, J., and J. K. Heath. 2000. Receptor recognition by gp130 cytokines. *EMBO J.* 19: 2399–2411.
 32. Perret, D., C. Guillet, G. Elson, J. Froger, H. Plun-Favreau, F. Rousseau, M. Chabbert, J. F. Gauchat, and H. Gascan. 2004. Two different contact sites are recruited by cardiotrophin-like cytokine (CLC) to generate the CLC/CLF and CLC/sCNTFR α composite cytokines. *J. Biol. Chem.* 279: 43961–43970.
 33. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235–238.
 34. Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb, and C. T. Weaver. 2006. Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. *Nature* 441: 231–234.
 35. Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley, and B. Stockinger. 2006. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24: 179–189.
 36. Molle, C., M. Nguyen, V. Flamand, J. Rennesson, F. Trottein, D. De Wit, F. Willems, M. Goldman, and S. Goriely. 2007. IL-27 synthesis induced by TLR ligation critically depends on IFN regulatory factor 3. *J. Immunol.* 178: 7607–7615.
 37. Schuster, B., M. Kovaleva, Y. Sun, P. Regenhart, V. Matthews, J. Grotzinger, S. Rose-John, and K. J. Kallen. 2003. Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited: the interleukin-6 receptor can serve as an α -receptor for CNTF. *J. Biol. Chem.* 278: 9528–9535.
 38. Plun-Favreau, H., G. Elson, M. Chabbert, J. Froger, O. deLapeyriere, E. Lelievre, C. Guillet, J. Hermann, J. F. Gauchat, H. Gascan, and S. Chevalier. 2001. The ciliary neurotrophic factor receptor α component induces the secretion of and is required for functional responses to cardiotrophin-like cytokine. *EMBO J.* 20: 1692–1703.
 39. Lelievre, E., H. Plun-Favreau, S. Chevalier, J. Froger, C. Guillet, G. C. Elson, J. F. Gauchat, and H. Gascan. 2001. Signaling pathways recruited by the cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 composite cytokine: specific requirement of the membrane-bound form of ciliary neurotrophic factor receptor α component. *J. Biol. Chem.* 276: 22476–22484.
 40. Naugler, W. E., and M. Karin. 2008. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol. Med.* 14: 109–119.
 41. Nishioka, Y., N. Nishimura, Y. Suzuki, and S. Sone. 2001. Human monocyte-derived and CD83⁺ blood dendritic cells enhance NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 31: 2633–2641.
 42. Anodoniu, C. E., S. L. van Dommelen, V. Voigt, D. M. Andrews, G. Brizard, C. Asselin-Paturel, T. Delale, K. J. Stacey, G. Trinchieri, and M. A. Degli-Esposti. 2005. Interaction between conventional dendritic cells and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity. *Nat. Immunol.* 6: 1011–1019.
 43. Fernandez, N. C., A. Lozier, C. Flament, P. Ricciardi-Castagnoli, D. Bellet, M. Suter, M. Perricaudet, T. Tursz, E. Maraskovsky, and L. Zitvogel. 1999. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat. Med.* 5: 405–411.
 44. Yu, Y., M. Hagihara, K. Ando, B. Gansuud, H. Matsuzawa, T. Tsuchiya, Y. Ueda, H. Inoue, T. Hotta, and S. Kato. 2001. Enhancement of human cord blood CD34⁺ cell-derived NK cell cytotoxicity by dendritic cells. *J. Immunol.* 166: 1590–1600.
 45. Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, C. Nisii, V. Marchesini, G. Carra, and G. Trinchieri. 2002. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195: 327–333.
 46. Andrews, D. M., A. A. Scalzo, W. M. Yokoyama, M. J. Smyth, and M. A. Degli-Esposti. 2003. Functional interactions between dendritic cells and NK cells during viral infection. *Nat. Immunol.* 4: 175–181.
 47. Zamai, L., M. Ahmad, I. M. Bennett, L. Azzoni, E. S. Alnemri, and B. Perussia. 1998. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J. Exp. Med.* 188: 2375–2380.
 48. Orange, J. S., and C. A. Biron. 1996. An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN- γ production and antiviral defense: studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections. *J. Immunol.* 156: 1138–1142.
 49. Walzer, T., M. Dalod, S. H. Robbins, L. Zitvogel, and E. Vivier. 2005. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force." *Blood* 106: 2252–2258.
 50. Ferlazzo, G., M. Pack, D. Thomas, C. Paludan, D. Schmid, T. Strowig, G. Bougras, W. A. Muller, L. Moretta, and C. Munz. 2004. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 16606–16611.
 51. Biron, C. A., K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens, and T. P. Salazar-Mather. 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 189–220.
 52. Koka, R., P. Burkett, M. Chien, S. Chai, D. L. Boone, and A. Ma. 2004. Cutting edge: murine dendritic cells require IL-15 α to prime NK cells. *J. Immunol.* 173: 3594–3598.
 53. Nguyen, K. B., T. P. Salazar-Mather, M. Y. Dalod, J. B. Van Deusen, X. Q. Wei, F. Y. Liew, M. A. Caligiuri, J. E. Durbin, and C. A. Biron. 2002. Coordinated and distinct roles for IFN- $\alpha\beta$, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J. Immunol.* 169: 4279–4287.
 54. Trinchieri, G. 1989. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* 47: 187–376.
 55. Lucas, S., N. Ghilardi, J. Li, and F. J. de Sauvage. 2003. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4⁺ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 15047–15052.

56. Takeda, A., S. Hamano, A. Yamanaka, T. Hanada, T. Ishibashi, T. W. Mak, A. Yoshimura, and H. Yoshida. 2003. Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J. Immunol.* 170: 4886–4890.
57. Krutzik, P. O., M. B. Hale, and G. P. Nolan. 2005. Characterization of the murine immunological signaling network with phosphospecific flow cytometry. *J. Immunol.* 175: 2366–2373.
58. Waldmann, T. A., S. Dubois, and Y. Tagaya. 2001. Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. *Immunity* 14: 105–110.
59. Tesmer, L. A., S. K. Lundy, S. Sarkar, and D. A. Fox. 2008. Th17 cells in human disease. *Immunol. Rev.* 223: 87–113.
60. Kebir, H., K. Kreymborg, I. Ifergan, A. Dodelet-Devillers, R. Cayrol, M. Bernard, F. Giuliani, N. Arbour, B. Becher, and A. Prat. 2007. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.* 13: 1173–1175.
61. O'Garra, A., and P. Vieira. 2007. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 425–428.
62. Trinchieri, G. 2007. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J. Exp. Med.* 204: 239–243.
63. Kuhn, R., J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky, and W. Muller. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75: 263–274.
64. Gazzinelli, R. T., M. Wysocka, S. Hieny, T. Scharton-Kersten, A. Cheever, R. Kuhn, W. Muller, G. Trinchieri, and A. Sher. 1996. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- γ and TNF- α . *J. Immunol.* 157: 798–805.
65. Ishihara, K., and T. Hirano. 2002. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13: 357–368.
66. Rose-John, S., J. Scheller, G. Elson, and S. A. Jones. 2006. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J. Leukocyte Biol.* 80: 227–236.
67. Sebba, A. 2008. Tocilizumab: the first interleukin-6-receptor inhibitor. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 65: 1413–1418.
68. Nishimoto, N., Y. Kanakura, K. Aozasa, T. Johkoh, M. Nakamura, S. Nakano, N. Nakano, Y. Ikeda, T. Sasaki, K. Nishioka, et al. 2005. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease. *Blood* 106: 2627–2632.
69. Smolen, J. S., A. Beaulieu, A. Rubbert-Roth, C. Ramos-Remus, J. Rovinsky, E. Alecock, T. Woodworth, and R. Alten. 2008. Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet* 371: 987–997.
70. Nishimoto, N., K. Yoshizaki, N. Miyasaka, K. Yamamoto, S. Kawai, T. Takeuchi, J. Hashimoto, J. Azuma, and T. Kishimoto. 2004. Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 50: 1761–1769.
71. Nishimoto, N., N. Miyasaka, K. Yamamoto, S. Kawai, T. Takeuchi, and J. Azuma. 2008. Long-term safety and efficacy of tocilizumab, an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody, in monotherapy, in patients with rheumatoid arthritis (the STREAM study): evidence of safety and efficacy in a 5-year extension study. *Ann. Rheum. Dis.* 68: 1580–1584.
72. Yokota, S., T. Imagawa, M. Mori, T. Miyamae, Y. Aihara, S. Takei, N. Iwata, H. Umebayashi, T. Murata, M. Miyoshi, et al. 2008. Efficacy and safety of tocilizumab in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, withdrawal phase III trial. *Lancet* 371: 998–1006.
73. Ito, H., M. Takazoe, Y. Fukuda, T. Hibi, K. Kusugami, A. Andoh, T. Matsumoto, T. Yamamura, J. Azuma, N. Nishimoto, et al. 2004. A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 126: 989–996, discussion 947.
74. Melton, L., and A. Coombs. 2008. Actemra poised to launch IL-6 inhibitors. *Nat. Biotechnol.* 26: 957–959.
75. Birch, H. 2009. GM poplars to grow next door. *Nat. Biotechnol.* 27: 107.
76. Richards, P. J., M. A. Nowell, S. Horiuchi, R. M. McLoughlin, C. A. Fielding, S. Grau, N. Yamamoto, M. Ehrmann, S. Rose-John, A. S. Williams, et al. 2006. Functional characterization of a soluble gp130 isoform and its therapeutic capacity in an experimental model of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 54: 1662–1672.
77. Nowell, M. A., P. J. Richards, S. Horiuchi, N. Yamamoto, S. Rose-John, N. Topley, A. S. Williams, and S. A. Jones. 2003. Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130. *J. Immunol.* 171: 3202–3209.
78. Atreya, R., J. Mudter, S. Finotto, J. Mullberg, T. Jostock, S. Wirtz, M. Schutz, B. Bartsch, M. Holtmann, C. Becker, et al. 2000. Blockade of interleukin 6 *trans* signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat. Med.* 6: 583–588.

MISE EN ÉVIDENCE DE L'INTERACTION DE LA PROTÉINE TAT DU VIH-1 AVEC LES PENTRAXINES HUMAINES : IMPACT SUR LA TRANSCRIPTION DU VIH ET LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES DENDRITIQUES

Résumé

L'immunité innée et l'immunité adaptative constituent les deux volets du système immunitaire. Contrairement à l'immunité adaptative qui utilise un vaste répertoire de récepteurs spécifiques obtenus par réarrangements géniques, l'immunité innée utilise un nombre réduit de récepteurs appelés « Pattern Recognition Receptors » ou PRR. Les PRR reconnaissent des motifs hautement conservés et exclusivement exprimés par les micro-organismes, et appelés « Pathogen-Associated Molecular Patterns » ou PAMP. Les PRR sont soit associés aux cellules (impliqués dans l'endocytose et/ou la signalisation), soit solubles (impliqués dans l'élimination des micro-organismes et du soi modifié). Les pentraxines courtes (SAP et CRP) et longues (PTX3) sont des PRR solubles impliqués dans la capture du non-soi et/ou du soi modifié et facilitent leur élimination par les phagocytes.

La protéine Tat du VIH-1 est indispensable à la synthèse du génome viral. Sa forme soluble, sécrétée par les cellules infectées, régule de nombreuses fonctions cellulaires. Cependant, la nature des structures de fixation de Tat soluble aux cellules reste mal connue. Nous avons montré que Tat interagit sélectivement avec les pentraxines SAP, CRP et PTX3. Cependant, et de manière inattendue, nous avons observé que seule la protéine CRP augmente la transcription in vitro du VIH-1 induite par Tat en favorisant son accumulation nucléaire. Nous avons également observé une influence significative de Tat et des complexes Tat/pentraxines sur la différenciation de monocytes en cellules dendritiques (DC). L'ensemble de ces données met en évidence un nouveau mécanisme mis en jeu par le VIH pour exploiter le bras humoral de l'immunité innée et échapper au système immunitaire. Des données préliminaires suggèrent également un rôle potentiel de Tat dans l'acquisition d'un phénotype immunosuppresseur par les cellules dendritiques.

En parallèle, dans le cadre d'un projet fédératif portant sur la régulation d'expression du FcγRIII (CD16), nous avons montré que les cytokines IL-1β, IL-6, IL-10 et IL-21 induisent non seulement l'augmentation d'expression de CD16 sur les monocytes/macrophages et son induction sur les DC, mais également son acquisition par la sous population monocyttaire CD14⁺ CD16⁻. Ces données suggèrent donc un rôle de ces cytokines dans la modulation d'expression de CD16 par les cellules myéloïdes.

Mots clés : Immunité innée, récepteurs de l'immunité innée, Pentraxine, HIV, Tat, cellules dendritiques, monocytes, cytokines

Abstract

Innate and adaptive immunity are the two components of the immune system. Unlike adaptive immunity which uses antigen-specific receptors generated by gene rearrangements, innate immunity uses a restricted number of receptors called "Pattern Recognition Receptors" or PRR. PRR recognize conserved motifs expressed by micro-organisms and called "Pathogen-Associated Molecular Patterns" or PAMP. PRR are either cell-associated (involved in endocytosis and/or in signaling) or soluble (involved in the clearance of microorganisms and altered self) molecules. The short (SAP and CRP) and long (PTX3) pentraxins, members of the soluble PRR family, bind to non-self and/or modified self and facilitate their elimination by phagocytes.

The HIV-1 protein Tat is crucial for the replication of the viral genome. A soluble form of Tat, secreted by infected cells, regulates several cellular and molecular processes. However, the mechanism involved in the interaction of soluble Tat with its target cells remains undetermined.

We have observed that Tat interacts selectively with the pentraxins SAP, CRP and PTX3. However, and unexpectedly, only CRP, an acute phase protein, increased the in vitro Tat-induced HIV transcription by promoting its nuclear accumulation. We have also observed that Tat and the Tat/pentraxin complexes favour the acquisition of an immunosuppressive phenotype by dendritic cells. Collectively, these studies highlight a new mechanism involved in the ability of HIV to exploit the humoral arm of innate immunity to evade the immune system and suggest a potential role of Tat in the acquisition of an immunosuppressive phenotype by myeloid cells.

In parallel, as part of a collaborative project focused on the regulation of FcγRIII (CD16) expression, we showed that IL-1β, IL-6, IL-10 and IL-21 increase CD16 expression on monocytes/macrophages and its induction on DC, and induce the acquisition of CD16 by the CD14⁺ CD16⁻ monocytes. These data suggest a role for these cytokines in modulating the expression of CD16 and/or the frequency of CD14⁺ CD16⁺ monocytes.

Key words : Innate immunity, Pattern Recognition Receptors, Pentraxins, HIV, Tat, dendritic cells, monocytes, cytokines