



**HAL**  
open science

# Le role de l'interaction des cellules dendritiques avec le virus HTLV-1 dans la dissémination virale : capture ou infection productive ?

Gergès Rizkallah

## ► To cite this version:

Gergès Rizkallah. Le role de l'interaction des cellules dendritiques avec le virus HTLV-1 dans la dissémination virale : capture ou infection productive ?. Virologie. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1099 . tel-01591915

**HAL Id: tel-01591915**

**<https://theses.hal.science/tel-01591915v1>**

Submitted on 22 Sep 2017

**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.



N°d'ordre NNT:2017LYSE1099

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de

**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° 340**

**Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire**

**Spécialité de doctorat** : Virologie

**Discipline** : Biologie

Soutenue publiquement le 30/06/2017, par :

**Gergès Rizkallah**

Le rôle de l'interaction des cellules  
dendritiques avec le virus HTLV-1 dans la  
dissémination virale :  
Capture ou infection productive ?

Devant le jury composé de :

Professeur Mathias Faure  
Docteur Claudine Pique  
Professeur Pierre-Emmanuel Ceccaldi  
Docteur Anna Salvetti  
Docteur Fabien Blanchet  
Docteur Hélène Dutartre

Président  
Rapportrice  
Rapporteur  
Examinatrice  
Examineur  
Directrice de thèse

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

**M. le Professeur Frédéric FLEURY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. X. PERROT

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

# REMERCIEMENTS

“La reconnaissance est la mémoire du coeur.”

Hans Christian Andersen

Ecrire les remerciements à la fin d'une thèse représente, pour moi, un acte de mémoire. Que ces quelques lignes constituent un hommage aux personnes ou institutions qui ont influé sur la construction de mon parcours académique et personnel.

Pour commencer, je remercie le Dr Claudine Pique et le Pr Pierre-Emmanuel Ceccaldi d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Je remercie également le Dr Anna Salvetti et le Dr Fabien Blanchet d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je remercie, enfin, le Pr Mathias Faure d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je vous remercie pour le temps que vous m'avez accordé.

Je remercie, par la même occasion, à nouveau, le Dr Anna Salvetti ainsi que le Dr Andréa Cimarelli et le Dr Philippe Afonso. A travers leur participation au jury de mon comité de suivi de thèse, j'ai pu profiter de leurs précieux conseils.

Mes remerciements vont ensuite à ma directrice de thèse, Dr Hélène Dutartre. Je lui dois ce superbe sujet de thèse qui m'a passionné tout au long des trois dernières années et qui s'est concrétisé par la publication d'un article. Merci, Hélène pour ta patience, pour les longues heures passées à m'auditionner avant un oral de congrès, à réfléchir sur les résultats de manipulations ou à corriger mes abstracts et, au final, mon manuscrit de thèse. Si j'éprouve, aujourd'hui, des facilités dans le montage du plan d'une manipulation, des figures d'articles ou d'un poster, c'est grâce à toi.

Mes pensées vont aussi au Pr Renaud Mahieux qui m'a accueilli dans son équipe. Merci, Renaud, pour toutes les réunions au cours desquelles tu nous as initié à la véritable réflexion scientifique critique. Merci pour toutes tes remarques constructives qui ont ponctué mon parcours de thèse. Merci de m'avoir donné, à quatre reprises, l'opportunité de participer à des congrès internationaux. Je te remercie pour la correction, en un temps record, de ce manuscrit de thèse alors que tu avais, concomitamment, d'autres préoccupations. Merci aussi d'avoir été un chef d'équipe juste, ferme et encourageant.

Je remercie, également, le Dr Chloé Journo pour tous les conseils ainsi que pour son apport efficace à la réalisation de l'acquisition des images en microscopie. Chloé, je n'oublierai jamais nos passages, avec Hélène, au microscope : chaque observation d'HTLV-1 donnait lieu à des flots de réflexion et les résultats devenaient plus concrets et les hypothèses plus réelles. C'est grâce à toi, que les créneaux de microscopie ont constitué des moments mémorables de mon cursus de thèse. Je profite, par la même occasion, pour remercier Christophe Chamot et Elodie Chatre, du Platim, pour leur aide incontournable dans l'acquisition des images ainsi que pour leurs multiples conseils et formations en imagerie desquels j'ai pu profiter.

Merci aux Dr Hubert Endtz, Dr Florence Pradel et Dr Glauca Baccala d'avoir facilité mon obtention de la bourse de la fondation Mérieux. C'est grâce à leur intervention efficace que j'ai pu poursuivre ma thèse jusqu'au bout des trois années. Merci, également au CNRS-Liban et à l'université Saint Joseph de Beyrouth qui ont également contribué au financement de ma thèse.



Je remercie, enfin, tous les doctorants et stagiaires que j'ai rencontrés au cours de mon parcours dans le CIRI. Je pense, en particulier, à Axel Rossi, ancien doctorant, avec qui j'ai partagé de longues et constructives réflexions sur les DCs, pierre angulaire commune à nos thèses. Je remercie Lola Perrin que j'ai eu la chance d'encadrer au cours de son stage. C'est grâce à la motivation dont elle a fait preuve, que je garde un excellent souvenir de ma première expérience d'encadrement. Je remercie aussi, particulièrement, Jocelyn Turpin, ancien doctorant de mon équipe, de qui j'ai hérité non seulement du bureau mais aussi de précieux conseils généraux sur la recherche. Je remercie aussi les nombreux collègues qui ont permis que le contact professionnel se développe en amitié. Sans vous, mon séjour lyonnais n'aurait pas été le même.

A un niveau personnel, je ne peux que remercier les deux institutions où j'ai eu la chance de poursuivre mes études scolaires puis universitaires : le collège Notre-Dame de Jamhour et l'université Saint Joseph de Beyrouth. C'est sur leurs bancs que j'ai appris la discipline et la rigueur dans le travail. J'espère qu'à mon retour, au Liban, je pourrai contribuer, directement ou indirectement, au gros travail de construction humaine qu'elles mènent. L'enseignement que j'ai reçu à Jamhour, il y a 26 ans, sur le bonheur d' "être des hommes et des femmes pour le service des autres" reste ma devise personnelle.

Ces quelques lignes sont l'occasion de remercier tous mes amis du Liban, en particulier Krystal. Merci pour votre fidélité qui s'est manifestée dans le contact régulier que nous avons pu maintenir. Vous êtes, pour moi, la preuve, que la distance peut resserrer les liens ! De plus, ce sont vos encouragements continus qui m'ont soutenu tout au long de ces trois années.

Un grand merci à mes amis "lyonnais". Vous avez constitué la famille que je me suis créée à Lyon. Merci Alex, Paul, Chloé (avec Léonie, Joseph et Marin)... Votre rencontre, nos sorties et nos souvenirs communs sont la preuve que l'amitié sincère et profonde peut encore naître, à l'âge adulte.

De même, un grand merci aux plus proches : mes feues tantes Jamale et Wadad parties en cours de ma thèse et qui continuent, sûrement, à veiller, sur moi. Un grand merci à ma sœur, Jamale et à mon beau-frère, Elie pour leurs encouragements constants et leur affection réconfortante et sans faille. Un grand merci à mon cher neveu et filleul Joseph pour le bonheur qu'il a créé, dans ma famille, depuis sa naissance, il y a un peu plus de deux années.

En dernier, mes remerciements vont à mes chers parents Claude et Joseph. Merci d'avoir bâti pour ma sœur et moi-même, une belle et solide famille. Merci d'avoir toujours été là pour nous, malgré toutes vos préoccupations, même lorsqu'on a commencé à battre de nos propres ailes. Merci pour votre générosité sans limites, pour votre amour inconditionnel et illimité, pour l'éducation à l'honnêteté, au respect, à la discipline et à l'amour du travail que vous nous avez transmis. Merci d'avoir été ce que vous êtes.

Et pour terminer, merci à ceux qui liront cet écrit.

Mercredi 7 Juin 2017,

Gergès

## RESUME

Le virus T lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1) est l'agent étiologique de la leucémie à cellules T de l'adulte (ATL) et de la paraparésie spastique tropicale/myélopathie associée à HTLV-1 (HAM/TSP). Chez les patients chroniquement infectés, le provirus d'HTLV-1 est majoritairement retrouvé dans les lymphocytes T CD4+. *Ex vivo*, on peut aussi retrouver le provirus dans les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes B, les monocytes, les cellules dendritiques (DCs) myéloïdes, les DCs plasmacytoïdes (pDCs) et les macrophages. *In vitro*, HTLV-1 est capable d'infecter productivement les cellules lymphoïdes et les cellules dendritiques dérivées de monocytes humains (MDDCs).

De part leur fonction et leur distribution dans l'organisme, les DCs pourraient être les premières cellules à interagir avec HTLV-1 au cours de la primo-infection. Elles seraient ensuite capables de transmettre HTLV-1 aux lymphocytes T CD4+. Cette hypothèse est soutenue par les travaux de notre équipe qui ont montré que les MDDCs sont plus susceptibles que des lymphocytes T autologues à l'infection par HTLV-1. Ainsi, les DCs constitueraient des relais importants pour l'établissement de l'infection chronique.

Dans ce contexte, nous nous sommes demandés si toutes les populations de DCs étaient également susceptibles à l'infection par HTLV-1 et si elles transmettaient similairement HTLV-1 aux lymphocytes T.

Pour cela, nous avons différencié trois sous types de MDDCs après l'exposition de monocytes humains à divers cocktails de cytokines :

- les IL4-DCs (pour interleukine 4 - DCs) miment les DCs immatures myéloïdes du sang,
- les TGF- $\beta$  DCs (pour tumor-growth factor  $\beta$  - DCs) miment les DCs mucoales à phénotype tolérogène,
- les IFN- $\alpha$  DCs (pour interféron  $\alpha$  DC) miment les DCs activées et inflammatoires recrutées au niveau des sites d'inflammation.

Nous avons aussi traité au lipopolysaccharide (LPS) des IL-4 DCs afin de générer des DCs qui sur-expriment les marqueurs de maturation CD80 et CD86.

Nos résultats montrent que les IFN- $\alpha$  DC et les IL-4 DCs traités au LPS ne supportent pas une infection productive au contraire des TGF- $\beta$  DCs et des IL4-DCs qui sont productivement infectés par HTLV-1. La restriction virale des IFN- $\alpha$  DC et les IL-4 DCs traitées au LPS n'est pas

due à leur production d'IFN. Nous avons montré que la susceptibilité des IL4-DCs à l'infection productive par HTLV-1 est liée à leur phénotype immature. De plus, nos résultats montrent qu'HTLV-1 est internalisé par macropinocytose dans les IL-4 DCs alors qu'il est internalisé par endocytose médiée par la clathrine dans les IFN- $\alpha$  DCs. Enfin, nous avons pu restaurer partiellement la susceptibilité à l'infection productive des IL-4 DCs traités au LPS et celle des IFN- $\alpha$  DCs et nous avons pu restreindre celle des IL-4 DCs immatures en modulant le pH de leurs endosomes. Ces résultats suggèrent que le virus utilise le trafic vésiculaire pour infecter les DCs et que le pH des vésicules conditionne, au moins partiellement, le devenir de l'infection productive. De plus, parmi les IL-4 DCs, les IL-4 DCs traités au LPS et les IFN- $\alpha$  DCs, seules les IL-4 DCs qui sont productivement infectées peuvent transmettre HTLV-1 aux lymphocytes T.

En conclusion, nos résultats suggèrent que c'est le sous-type de DC que rencontre HTLV-1 lors de la primo-infection ainsi que le trafic viral d'HTLV-1 dans la DC qui conditionnent ou pas l'établissement de l'infection productive de la DC ainsi que la transmission aux lymphocytes T.

## SUMMARY

HTLV-1 (Human T cell leukemia/lymphoma virus type 1) is the etiological agent of Adult T cell Leukemia/Lymphoma (ATLL) and HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). In chronically infected patients, the provirus is mainly detected in the CD4 T-cell population and, to a lesser extent in myeloid dendritic cells (DCs), plasmacytoid DCs (pDCs), macrophages and monocytes. Among the different DCs subsets found *in vivo*, myeloid DCs from the blood, tolerogenic or inflammatory DCs from mucosa may first encounter HTLV-1 during blood transmission, breast-feeding or sexual transmission, respectively. They would then be able to transmit HTLV-1 to CD4 + T cells. This hypothesis is supported by the recent work of our team that showed that monocyte derived dendritic cells (MDDCs) are more susceptible to HTLV-1 infection in comparison to autologous T cells. We therefore asked whether all these DCs subsets were equally susceptible to HTLV-1 and whether the nature of the DC subset would impact HTLV-1 spread to T-cells.

Human monocytes obtained from healthy blood donors were differentiated into IL-4 DCs, TGF- $\beta$  DCs or IFN- $\alpha$  DCs. *In vitro*-derived immature IL-4 DCs, TGF- $\beta$  DCs and IFN- $\alpha$  DCs mimic myeloid, tolerogenic and inflammatory DCs, respectively. We also generated LPS-matured IL-4 DCs that exhibited a strong maturation profile with over-expression of maturation markers.

We observed HTLV-1 protein expression and provirus accumulation in IL-4 DCs and TGF- $\beta$  DCs but not in IFN- $\alpha$  DCs and LPS-matured IL-4 DCs. Despite their increased ability to capture HTLV-1 virion compared to IL-4 DCs and TGF- $\beta$  DCs, IFN- $\alpha$  DCs and LPS-matured IL-4 DCs restricted HTLV-1 productive infection. This was not due to the antiviral activity of type-I interferon produced by IFN- $\alpha$  DC or LPS-matured IL-4 DCs. In contrast, we showed that these differences in susceptibility to HTLV-1 infection might be linked to the maturation phenotype of the DCs subsets and to a different trafficking of HTLV-1 in IL-4 DC vs. IFN- $\alpha$  DC. Finally, using IL-4DCs, LPS-matured IL-4 DCs and IFN- $\alpha$  DCs, we demonstrate that productive infection rather than trans-infection is required for HTLV-1 transmission from DCs to CD4 T-cells.

Thus, our results demonstrate that the nature of the DCs encountered by HTLV-1 during primo-infection and the trafficking route of the virus through the vesicular pathway of these cells determine the efficiency of viral transmission to T-cells.

# TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	3
<b>RESUME</b> .....	5
<b>SUMMARY</b> .....	7
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	8
<b>ABREVIATIONS</b> .....	10
<b>TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX</b> .....	15
<b>1 INTRODUCTION</b> .....	16
1 Introduction sur le rétrovirus HTLV-1 .....	17
1.1 Découverte du rétrovirus HTLV-1 .....	17
1.2 Description d'HTLV-1.....	18
1.2.1 Description de la particule virale .....	18
1.2.2 Description du génome d'HTLV-1 .....	18
1.2.3 Description des protéines de la région pX d'HTLV-1 et leurs fonctions.....	19
1.2.4 Cycle viral et mise en évidence de l'infection par HTLV-1 .....	22
1.3 Répartition géographique, incidence et prévalence d'HTLV-1 .....	23
1.4 Pathologies associées à HTLV-1.....	25
1.4.1 ATL.....	26
1.4.2 HAM/TSP .....	30
1.4.3 Autres pathologies associées à HTLV-1 .....	33
1.5 Trois voies de transmission inter-humaines .....	33
1.5.1 Transmission verticale par allaitement.....	33
1.5.2 Transmission sexuelle .....	35
1.5.3 Transmission horizontale sanguine d'HTLV-1 .....	35
1.6 Tropisme viral.....	36
1.7 Récepteurs d'entrée virale à HTLV-1 .....	36
1.8 Capacité migratoire des cellules infectées par HTLV-1.....	36
1.9 Mécanismes de transmission inter-cellulaires d'HTLV-1 .....	36
2 Revue Médecine/Sciences .....	37
3 Les Cellules Dendritiques : définition, fonctions et sous-types .....	46

3.1	Définition des cellules dendritiques (DCs) .....	46
3.2	Fonctions des DCs .....	47
3.2.1	Reconnaissance des pathogènes via les TLRs, maturation et migration des DCs .....	47
3.2.2	La présentation antigénique et la sécrétion des cytokines par les DCs .....	49
3.2.3	La production de l'interféron par les DCs.....	52
3.3	Sous-types de DCs <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> .....	55
3.3.1	Cellules dendritiques classiques (cDCs) .....	56
3.3.2	Cellules dendritiques plasmacytoïdes .....	58
3.3.3	Cellules dendritiques inflammatoires.....	59
3.3.4	Cellules de Langerhans (LCs).....	59
3.3.5	Cellules dendritiques dérivées de monocytes (MDDCs) <i>in vitro</i> .....	60
4	Interactions DCs et virus.....	63
4.1	Les virus détournent les fonctions des cellules dendritiques .....	63
4.2	L'entrée par endocytose et les compartiments empruntés par le virus lors de son trafic dans les DCs le protègent .....	66
4.2.1	Les compartiments non conventionnels permettent aux virus d'échapper au lysosome.	68
4.2.2	VIH-1 échappe à la dégradation dans le lysosome .....	69
4.3	Les DCs disséminent les virus.....	71
4.3.1	Les DCs ne transmettent pas similairement VIH-1 aux lymphocytes T .....	72
4.4	L'infection productive : lorsque la DC produit le virus qu'elle doit éliminer .....	73
4.4.1	Les agents lysosomotropes modulent l'infection productive .....	77
5	Interactions DCs et HTLV-1 : Qu'en savons-nous ? .....	79
5.1	HTLV-1 détourne les fonctions des DCs .....	79
5.2	La nature des compartiments empruntés par HTLV-1 dans les MDDCs est méconnue .....	80
5.3	Les DCs capturent et disséminent HTLV-1 .....	81
5.4	Les DCs s'infectent productivement par HTLV-1 .....	83
<b>2</b>	<b>Problématique</b> .....	<b>86</b>
<b>3</b>	<b>Article</b> .....	<b>89</b>
<b>4</b>	<b>Discussion</b> .....	<b>141</b>
<b>5</b>	<b>Bibliographie</b> .....	<b>156</b>
<b>6</b>	<b>Document annexe</b> .....	<b>186</b>
	Quand le cytosquelette d'actine fait le jeu des rétrovirus .....	186

## ABREVIATIONS

### A

ADAR1	adenosine deaminase acting on RNA
ADAR1	adenosine deaminase acting on RNA
ADNc	ADN complémentaire
APOBEC3	apolipoprotéin B mRNA-editing catalytic polypeptide-like 3C
Arp2/3	actin related protein 2/3
ASLV	avian sarcoma and leukosis virus,
ATFs	activating transcription factors
ATL	leucémie à cellules T de l'adulte
AZT	azidothimidine

### B

BER	base excision repair
-----	----------------------

### C

CA	capside
CADM1	cell adhesion molecule 1
CCR1	C-C motif chemokine receptor type 1
CCR4	C-C motif chemokine receptor type 4
CCR7	C-C motif chemokine receptor type 7
Cdc42	cell division cycle 42
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	cytomégalovirus
CPA	cellules présentatrices d'antigènes
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element-binding protein
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 ou CD152
CVB	Coxsackie virus B

### D

DAMP	damage associated molecular pattern
DC	cellule dendritique
DC-SIGN	dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin
dNTPS	désoxyrironucléotides triphosphates
DPI	chlorure de diphenyleneiodonium

## **E**

EBV	Epstein-Barr Virus
EEA1	early endosome antigen 1
Env	enveloppe

## **G**

Glut-1	récepteur du glucose
GM-CSF	granulocyte-monocyte colony stimulating factor

## **H**

HAM/TSP	paraparésie spastique tropicale/myélopathie associée à HTLV-1
HBZ	HTLV-1 bZIP factor
HDACis	histone deacetylase inhibitors
HPV	human papilloma virus ou papillomavirus humain
HSPGs	héparanes sulfates protéoglycanes
HTLV-1	human T cell leukemia/lymphoma virus type 1

## **I**

ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IDO	tryptophan-catabolizing indoleamine 2,3-dioxygénase
IFN	interféron
IL-	interleukine
ILT3	inhibitory immunoglobulin-like transcript 3
ILT4	inhibitory immunoglobulin-like transcript 4
IN	intégrase
iNOS	inductible nitric oxide synthase
IP-10	interferon gamma-induced protein 10
IRF	interferon response factor
ISG	interferon-stimulated genes ou gènes stimulés par l'interféron

## **L**

Lamp1	lysosomal associated membrane protein 1
LC	cellules de Langerhans
LEL	large extracellular loop
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen-1



LTR long terminal repeat

## M

MA matrice  
MAPK mitogen-activated protein kinase  
MDDC cellule dendritique dérivée de monocyte  
MFI mean fluorescence intensity ou intensité de fluorescence moyenne  
MMR human mismatch repair  
MST maladie sexuellement transmissible  
MVA modified vaccina virus Ankara  
Myd88 myeloid differentiation primary response protein 88

## N

NEMO NF- $\kappa$ B Essential Modulator  
NC nucléocapside  
NER nucleotide excision repair  
NHEJ non-homologous end joining  
NOX2 NADPH oxydase  
NRP/Optineurine NEMO-Related Protein / Optineurin  
NRP-1 neuropiline-1

## P

*P. gingivalis* *Porphyromonas gingivalis*  
PAMP pathogen or damage associated molecular pattern  
PBMC peripheral blood mononuclear cells  
PCAF p300/CBP-associated factor  
PD-1 programmed cell death -1  
pDC cellule dendritique plasmacytoïde  
PGE2 prostaglandine E2  
PGDS prostaglandine-D-synthase  
PI3K phosphatidyl inositol 3 kinase  
PKC protéine kinase C  
PKR protéine kinase R  
PKR serine/threonine protein kinase  
PR protéase  
PRRs pattern recognition receptor

## R

RAC2	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)
RHIM	RIP homotypic interaction motif
ROS	reactive oxygen species
RT	transcriptase inverse

## S

S1P	sphingosines-1-phosphate
SAMHD1	SAM domain and HD domain-containing protein 1
SFDCs	cellules dendritiques isolées du fluide synovial
SIGLEC-1	sialic acid binding Ig-like lectin 1
SIV	simian immunodeficiency virus
SNC	système nerveux central
SOCS1	suppressor of cytokine signaling protein 1
SRF	facteur de réponse au Sérum
SU	sous-unité de surface

## T

TAP	transporter associated with antigen processing
Tax	transcriptional Activator of pX region
TAX1BP1	Tax1 binding protein
TBK1	TANK-binding kinase 1
TCR	T-cell receptor ou récepteur du lymphocyte T
TGF- $\beta$	tumor growth factor - $\beta$
TIGIT	T-cell immunoglobulin and ITIM domain
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein
TLR	Toll-like receptor
TM	trans-membranaire
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
TRAM	TRIF-related adaptor molecule ou TICAM2
TRE	Tax response element
Treg	lymphocytes T régulateurs
TRIF	TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN $\beta$ ou TICAM1
TRIF	Toll-dependent TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
TRIM5 $\alpha$	tripartite motif-containing protein 5

## V

VHB	virus de l'hépatite B
VHC	virus de l'hépatite C
VIH ou VIH-1	virus de l'immunodéficience humaine
VRS	virus respiratoire syncytial
VSV	virus de la stomatite vésiculaire

## TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

<b>Numéro de la figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
1	Cycle viral d'HTLV-1	23
2	Interaction DC-SIGN et TRIM5 $\alpha$ lors de l'infection productive	146
3	Schéma hypothétique sur la différence de capture d'HTLV-1	149

<b>Numéro du tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
1	Sous-catégories d'ATL	27 et 28
2	Autres pathologies associées à HTLV-1	33
3	Orientations immunes	52
4	Fonctions anti-virales de 6 ISGs	53 et 54
5	Interaction DC/ virus	74 à 77
6	Classification des inhibiteurs de l'acidification des endosomes	78

# 1 INTRODUCTION

## 1 Introduction sur le rétrovirus HTLV-1

### 1.1 Découverte du rétrovirus HTLV-1

Uchiyama *et al.* ont décrit, en 1977, une grande série de patients Japonais atteints de leucémie à cellules T de l'adulte (ATL). Dans leur description des patients, Uchiyama *et al.* prenaient en compte leurs caractéristiques cliniques (inflammation des ganglions, augmentation du volume du foie et de la rate) mais aussi cytologiques (existence de noyau leucocytaire polylobé). Ils prenaient aussi en compte la distribution géographique des cas décrits et le lieu de naissance de chacun des patients. Ils postulèrent que leur 16 cas de patients étaient atteints d' "un nouveau syndrome lymphoprolifératif". Pour eux, c'est une infection virale qui en serait à l'origine (Uchiyama et al., 1977).

Le mycosis fongoïdes est une pathologie cutanée rare également appelée "lymphome cutané à cellules T". C'est à partir de deux lignées cellulaires lymphoblastoïdes (Hut102 et CTCL-3) en provenance d'un homme de 28 ans atteint de cette pathologie que l'équipe de Gallo parvint à isoler un rétrovirus, en 1979. En microscopie électronique, le diamètre des particules virales fut estimé entre 100 à 110 nm. Avec ces données, l'équipe de Gallo décrivit pour la première fois ce qui sera le HTLV-1 (Human T cell Leukemia/Lymphoma virus type 1), le premier rétrovirus humain oncogène (Poiesz et al., 1980).

Plus tard, en 1982, une équipe au Japon a mis en évidence un rétrovirus dénommé ATLTV dans des lignées cellulaires humaines de leucémies à cellules T de l'adulte. Le provirus d'ATLTV fut aussi détecté dans les lymphocytes périphériques de 5 patients atteints d'ATL. Ceci suggéra une éventuelle corrélation entre le rétrovirus ATLTV et le développement du processus lymphoprolifératif de l'ATL (Yoshida et al., 1982).

C'est enfin le séquençage et la comparaison des génomes d'HTLV-1 et ATLTV qui ont permis de concilier les précédentes conclusions : ATLTV et HTLV-1 sont en réalité le même virus. (Popovic et al., 1982).

## 1.2 Description d'HTLV-1

### 1.2.1 Description de la particule virale

Le rétrovirus HTLV-1 est un membre de la famille des *Retroviridae*. Il appartient à la sous-famille des *Orthoretrovirinae* et au genre des *Deltaretrovirus*. Le virion mature est sphérique et enveloppé. La protéine d'enveloppe (Env) est formée de deux sous-unités : la protéine trans-membranaire gp21 (TM) et la protéine de surface gp46 ou sous-unité de surface (SU) qui résultent du clivage d'une protéine codée par le gène *env* d'HTLV-1. TM et SU assurent la liaison et la fusion d'HTLV-1 aux membranes cellulaires durant l'entrée virale (Pour revue, (Jones et al., 2011)). Gag ou p55 est une protéine codée par le gène *gag*. Cette protéine est myristilée, traduite et adressée vers la face hydrophobe de la membrane plasmique de la cellule où elle est clivée par la protéase virale en ses 3 unités fonctionnelles : la capsid (CA ou p24), la nucléocapsid (NC ou p15) et la matrice (MA ou p19) (Lairmore et al., 2012). La MA est localisée sous l'enveloppe. La CA, dense, renferme deux copies d'ARN associées aux protéines de NC p15 et est localisée au centre du virion. La transcriptase inverse (RT), l'intégrase (IN) ainsi que la protéase (PR) qui est l'enzyme responsable du clivage des protéines structurales d'HTLV-1 sont incluses dans la particule virale.

### 1.2.2 Description du génome d'HTLV-1

Le génome d'HTLV-1 est constitué de deux ARN simple brin de 9032 nucléotides de polarité positive. Comme chez les autres rétrovirus, le génome proviral d'HTLV-1 présente à son extrémité 5' et 3' des séquences répétées appelées LTR (Long Terminal Repeat). Nous parlons de provirus lorsque le génome d'HTLV-1 a été incorporé dans le génome cellulaire après pénétration du génome viral dans la cellule. Le LTR 5' contient un promoteur qui contrôle l'expression des gènes *gag*, *pol*, *env* ainsi que les gènes de la région pX. Ces gènes codent respectivement pour les protéines structurales et enzymatiques Gag, Pro, Pol et Env et pour les protéines régulatrices de la région pX : Tax, Rex, p12/p8, p13 et p30. Le LTR 3' contient un promoteur qui permet la transcription à partir du brin anti-sens d'un ARNm codant pour une protéine régulatrice HBZ.

### 1.2.3 Description des protéines de la région pX d'HTLV-1 et leurs fonctions

Le génome d'HTLV-1 contient une région pX en 3' qui code les protéines de régulation (Tax, Rex et HBZ) et les protéines accessoires (p21, p12, p13 et p30). La connaissance des mécanismes d'action de ces protéines revêt un double intérêt. En effet, les mécanismes d'action de Tax, par exemple, éclairent sur l'étiologie de l'ATL, une pathologie associée à HTLV-1 que j'aborde dans le paragraphe 1.4. De plus, les protéines p30, p12 et p13 d'HTLV-1 permettent de détourner les fonctions cellulaires au profit de la persistance virale, mécanisme auquel je m'intéresse particulièrement au cours du quatrième chapitre de l'introduction et dans mon étude.

#### 1.2.3.1 Tax (Transcriptional Activator of pX region), la protéine activatrice

Tax est une protéine de 353 acides aminés :

- Tax active différents facteurs de transcription : par exemple, Tax interagit avec les facteurs de transcription de la famille CREB/ATF (Franklin et al., 1993). Tax recrute également des co-activateurs transcriptionnels comme P/CAF, les facteurs de transcription de la famille Ets, c-Myb (Perini et al., 1995). De plus, à travers l'activation de la protéine cellulaire SRF (facteur de réponse au sérum), Tax active indirectement les gènes c-fos, Erg-1, Erg-2, Fra-1, c-Jun et Jun D (Winter and Marriott, 2007). De plus, Tax active la voie NF- $\kappa$ B à travers sa liaison avec TAX1BP1 (pour Tax1 binding protein) (Gachon et al., 1998), NEMO/IKK $\gamma$  (pour NF- $\kappa$ B Essential Modulator) (Kovalenko and Wallach, 2006) et NRP/Optineurin (pour NEMO-Related Protein) au niveau des cellules infectées par HTLV-1 (Journo et al., 2009). La voie NF- $\kappa$ B qui est constitutivement activée au niveau des cellules infectées par HTLV-1 contribue à l'oncogenèse de l'ATL que je développerai dans le chapitre 1.4.1.2.
- Tax conduit à l'expression de multiples cytokines : IL-1, -2, -2R $\alpha$ , -3,-4,-6,-8, GM-CSF (Granulocyte-monocyte colony stimulating factor), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) et TNF- $\beta$  (Maruyama et al., 1987).
- Tax inhibe l'apoptose.
- Tax interfère avec les mécanismes de réparation de l'ADN.
- Tax interfère avec les régulateurs du cycle cellulaire.

C'est à travers ces 4 mécanismes que Tax manipule le cycle cellulaire et permet la prolifération ainsi que la transformation des lymphocytes T lors de l'ATL.



La revue de (Kfoury et al., 2005) détaille ces 4 mécanismes d'action de Tax.

Tax module également la réponse innée médiée par l'interféron (IFN), une protéine produite suite à une infection par les cellules du système immunitaire (leucocytes, fibroblastes, DCs, cellules NK). L'IFN limite l'expression d'HTLV-1 *in vivo* (Kannagi et al., 2012) et *in vitro* (Cachat et al., 2013). L'IFN peut aussi être produit par les cellules infectées. Cependant, dans ces cellules, Tax peut bloquer l'induction de l'IFN et moduler la signalisation induite par l'IFN. En effet, Yuen a montré que la protéine Tax d'HTLV-1 inhibe la production de l'IFN à travers l'inhibition de la kinase TBK1 qui ne peut plus phosphoryler le facteur 3 de réponse à l'interféron, IRF-3. Ici, l'induction de la transcription de l'IFN- $\beta$  est altérée aussi bien au niveau des lymphocytes ATL que des lymphocytes fraîchement infectés. De plus, Tax réprime efficacement l'induction de la production de l'IFN même à la suite de l'induction de RIG-I et STING, deux détecteurs de l'ARN d'HTLV-1 (Yuen et al., 2016). Similairement, Hyun a montré que malgré l'induction de MDA5, un détecteur cellulaire de l'ARN d'HTLV-1, il peut y avoir un échappement à la production de l'IFN. Cet échappement se fait ici à travers la liaison de Tax au domaine RHIM (pour RIP homotypic interaction motif) de TRIF (pour Toll-dependent TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ). La liaison de Tax au domaine RHIM résulte, ici, en l'inhibition du facteur 7 de réponse à l'interféron IRF-7 (Hyun et al., 2015).

Enfin, l'étude de Zhang a montré que Tax inhibe l'induction des ISGs (gènes stimulés par l'IFN) à travers la compétition entre Tax et STAT2 pour le complexe CREB/p300 au niveau des cellules Huh-7 (Zhang et al., 2008). Tous ces exemples suggèrent que Tax prévient l'IFN- $\alpha$  d'exercer ses effets anti-viraux ce qui contribue à la persistance de l'infection virale.

#### 1.2.3.2 Rex, p30, p12/p8 et p13 : 5 protéines au service de la prolifération virale

Les protéines Rex (Nicot et al., 2004), p30 (Silverman et al., 2004), p12/p8 (Valeri et al., 2010) et p13 (Hiraragi et al., 2006) favorisent l'établissement et la persistance de l'infection virale.

En l'absence de la protéine Rex qui contient un domaine de liaison (Rex responsive element (RxRE)) à tous les ARNm d'HTLV-1, les ARNm d'HTLV-1 sont exportés moins efficacement vers le cytosol (Younis and Green, 2005) et (Bai and Nicot, 2012) et (Nakano and Watanabe, 2012). Cependant, les interactions de Rex et de p30, une autre protéine régulatrice d'HTLV-1 altèrent à une étape post-transcriptionnelle l'expression des gènes viraux. En effet, p30 se lie à

l'ARNm de *tax/rex* dans le noyau et prévient sa sortie dans le cytoplasme pour traduction (Nicot et al., 2004). De même, p30 qui est exprimée au niveau du noyau cellulaire module la persistance virale par différents mécanismes : en premier, p30 interagit avec la sous-unité ribosomale L18a ce qui module l'initiation de la transcription (Ghorbel et al., 2006). Ensuite, p30 peut diminuer l'activité du LTR d'HTLV-1 à travers l'entrée en compétition avec le complexe CBP/p300 sur le TRE (Tax response element). Enfin, p30 inhibe les mécanismes de réparation de l'ADN en ciblant le complexe de la réparation des mésappariements ou mismatch repair (MMR). Ce système est l'un des six grands systèmes de réparation au sein des cellules vivantes qui permettent la réparation de l'ADN à la suite des mésappariements. Ces mésappariements causent l'augmentation du risque de transformation cellulaire particulièrement lors de l'ATL (Baydoun et al., 2011).

De plus, la protéine p12 interfère avec la présentation antigénique *in vivo* par les DCs. Ceci faciliterait l'échappement d'HTLV-1 à la reconnaissance par le système immunitaire. Pour cela, p12 lie les chaînes lourdes du complexe majeur d'histocompatibilité CMH-I et conduit, ensuite, à leur dégradation dans le protéasome (Johnson et al., 2001).

p8 qui provient du clivage de p12 induit l'anergie des lymphocytes T infectés qui représentent la population majoritairement infectée chez les individus infectés par HTLV-1. L'induction de l'anergie se fait à travers la sous-régulation de la signalisation via le TCR (T-cell receptor) au niveau de la synapse immunologique (Fukumoto et al., 2007). Ainsi, les lymphocytes T infectés échappent à la reconnaissance par le système immunitaire. A travers l'augmentation des contacts entre lymphocytes T à travers les lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1), p8 contribue également à augmenter la transmission virale (Van Prooyen et al., 2010).

La revue de (Bai and Nicot, 2012) éclaire davantage sur les fonctions de p12/p8, p30 et p13 lors de la persistance de l'infection et la pathogenèse virale.

#### 1.2.3.3 HBZ (HTLV-1 bZIP factor)

Le gène *hbz* est transcrit à partir du 3' LTR en deux ARNm : un ARNm épissé et à un ARNm non épissé. Les différences au niveau des protéines traduites à partir de ces deux ARNm sont respectivement de 4 acides aminés et de 7 acides aminés. La protéine HBZ est exprimée de manière constitutive chez tous les individus infectés par HTLV-1. HBZ est exprimée chez les patients ATL ce qui suggère qu'elle contribue au maintien du processus leucémogène (Wu et al., 2016). D'ailleurs, l'introduction d'une mutation dans le gène d'*hbz* du clone moléculaire d'HTLV-

Il résulte en la réduction de la croissance des tumeurs dans un modèle murin d'ATL (Arnold et al., 2008). HBZ agit en régulateur négatif de la transcription virale (Gaudray et al., 2002). Ceci se fait à travers la formation des dimères avec CREB-2 ce qui prévient leur recrutement par Tax au niveau du TRE. La régulation de la transcription se fait à travers la formation de dimères entre HBZ et des protéines importantes pour la transcription comme JunD, JunB et c-Jun. Ceci diminue leur activité transcriptionnelle (Basbous et al., 2003). Récemment, Ma a montré que HBZ supprime l'expression de la cycline D1 à travers l'inhibition de la voie de signalisation NF-κB (Ma et al., 2017). Ceci a pour conséquence d'altérer la progression du cycle cellulaire au niveau des cellules infectées par HTLV-1 et de contribuer conséquemment au développement de l'ATL. HBZ accomplit aussi des fonctions immunes à travers l'induction de la différenciation des Treg (pour lymphocytes T régulateurs qui participent à la tolérance immune), l'altération de l'immunité cellulaire et l'induction de l'inflammation. Les fonctions d'HBZ au cours de l'oncogenèse sont résumées dans la revue de Zhao (Zhao, 2016).

#### 1.2.4 Cycle viral et mise en évidence de l'infection par HTLV-1

Le cycle viral d'HTLV-1 comprend deux étapes :

- Les étapes précoces qui incluent :
  - l'entrée virale qui comprend deux étapes majeures : la liaison d'HTLV-1 aux récepteurs présents à la surface de la cellule cible puis la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique de la cellule cible qui libère la capsid virale
  - la transcription inverse de l'ARN viral en ADN
  - la translocation dans le noyau puis l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte.

Toutes ces étapes sont accomplies grâce aux enzymes du virion sans besoin de synthèse *de novo* de protéines virales structurales.

- Les étapes tardives utilisent les machineries de transcription génétique et de synthèse protéique pour compléter le processus d'expression des gènes viraux ainsi que l'assemblage protéique. Le néovirus peut, à nouveau, être transmis à une cellule receveuse.

La figure 1 résume les étapes précoces et tardives du cycle viral.

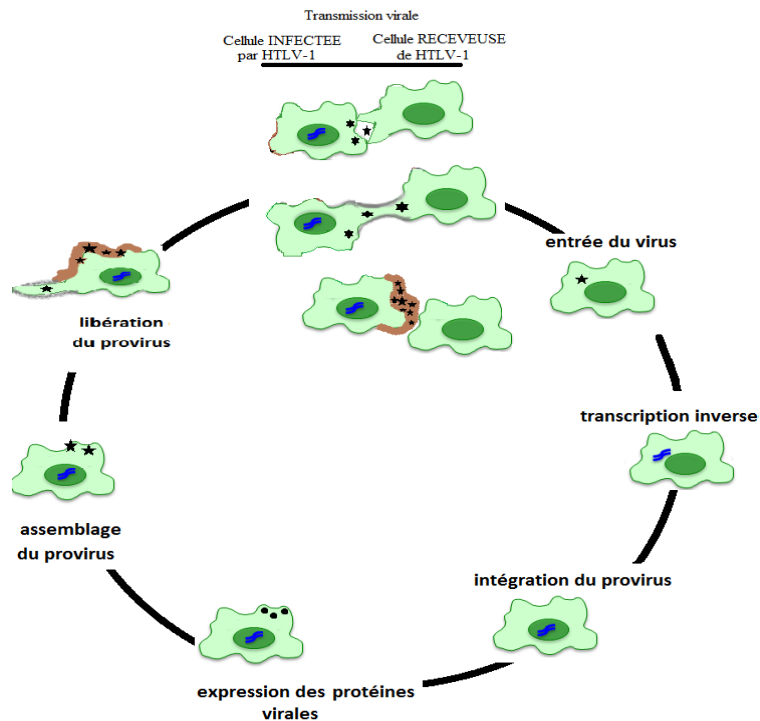


Figure 1 : Cycle Viral d’HTLV-1 en six étapes. Les six étapes décrites ci-dessus lors de la transmission d’HTLV-1 d’une cellule infectée à une cellule receveuse de virus permettent de suivre l’infection de la cellule receveuse mais aussi la transmission du virus à partir de la cellule receveuse. Les virions sont transmis à partir d’une cellule infectée selon trois voies de transmission intercellulaires : les synapses virologiques, les conduits et les biofilms. Ces trois mécanismes de transmission inter-cellulaire sont décrits dans la revue (Rizkallah et al., 2015).

Lors de mon étude des interactions d’HTLV-1 et des sous-types de MDDCs je m’arrêterai, en premier, sur l’entrée virale, l’intégration du provirus et l’expression des protéines virales dans chacun des sous-types de MDDCs. Enfin, j’étudierai la transmission d’HTLV-1 à partir de chacun des sous-types de MDDCs aux lymphocytes T.

### 1.3 Répartition géographique, incidence et prévalence d’HTLV-1

Aussitôt que le lien causal entre HTLV-1 et la leucémie à cellules T de l’adulte (ATL) fut établi, des études furent initiées afin de cerner la distribution mondiale d’HTLV-1. Elles permirent rapidement de conclure qu’HTLV-1 n’est pas un virus ubiquitaire. HTLV-1 est endémique au sud-est du Japon, dans l’Afrique sub-saharienne, en Amérique du sud, aux Caraïbes. Cependant, même dans ces zones, sa distribution n’est pas homogène (Gessain and Cassar, 2012).

La recherche des anticorps anti-HTLV-1 par ELISA sur des sérums de donneurs de sang en Afrique (Uganda, Côte d'Ivoire...), aux Caraïbes et aussi en provenance de groupes ethniques (Guinée, République Dominicaine, Martinique) avaient permis à deThé et Bomford d'estimer en 1985 le nombre total de porteur d'HTLV-1 entre 10 et 20 millions d'individus (de-Thé et al., 1985). Cependant Gessain et Cassar ont estimé, trente années plus tard, ce même nombre entre 5 à 10 millions (Gessain and Cassar, 2012). Leurs résultats sont obtenus en analysant des études effectuées sur des régions où HTLV-1 est endémique et qui sont représentatives de 1.5 milliards d'individus. Gessain et Cassar notent toutefois que leurs conclusions peuvent être sous-estimées du fait que certaines de ces études ne sont pas toujours représentatives de la population générale : Certaines concernent seulement les donneurs de sang alors que d'autres ne s'intéressent à la prévalence d'HTLV-1 qu'au niveau d'une population de femmes enceintes ou de patients hospitalisés.

Aux Etats-Unis, les taux de séroprévalence se situent à moins de 0.1%. Les infections à HTLV-1 restent cependant hautement endémiques parmi les toxicomanes au niveau desquels ces taux peuvent atteindre 20% (Freeman et al., 1995).

Si, en Europe la prévalence d'HTLV-1 dans une population d'individus donnant son sang pour la première fois est de 0.4/10000, la Roumanie est une exception. La prévalence d'HTLV-1 lors des dons sanguins y est de 5.3 cas sur 10000 ce qui en fait une région endémique Européenne pour HTLV-1 (Laperche et al., 2009).

En Afrique de l'ouest, la séroprévalence varie, selon Gessain et Cassar entre 0.2 à 3%. Par exemple, la séroprévalence varie entre 0.7 à 3.7% au Nigeria (Analo et al., 1998). En Afrique centrale, au Cameroun, la séroprévalence varie entre 0.5% et 2%. Cependant, dans cette région, les taux de prévalence peuvent atteindre 10% chez certains groupes de Pygmées (Filippone et al., 2012). Dans certains villages du Gabon, la séroprévalence chez les femmes peut atteindre 25% (Le Hesran et al., 1994). En Amérique du sud, les peuples indigènes appartenant aux groupes Amérindiens ont des séroprévalences qui atteignent 1.9% (Vasquez et al., 1991). Le Brésil à lui seul hébergerait plus de 2 millions de porteurs d'HTLV-1 (Bittencourt et al., 2009). Chez les donneurs de sang, au Brésil, la prévalence d'HTLV-1 se situerait à une moyenne de 1/1000 (Carneiro-Proietti et al., 2012). Aux Caraïbes, la moyenne de séroprévalence d'une large cohorte de 13260 Jamaïcains se situait à 6.1% (Murphy et al., 1991). Le Japon est un important foyer endémique : plus de 4200 nouvelles infections y sont détectées annuellement (Satake et al., 2016).

Plus de 1000 nouveaux cas d'ATL y sont diagnostiqués annuellement (Watanabe, 2011). La transmission sexuelle est impliquée dans le maintien de la prévalence élevée d'HTLV-1 au Japon qui se situe à 2.29 cas pour 100000 hommes et de 6.88 cas pour 100000 femmes (Satake et al., 2016). Malgré cette prévalence élevée au Japon, il n'est toujours pas clair pourquoi de faibles séroprévalence sont retrouvées à l'est de la Chine et de la Corée: en Corée, la séroprévalence varie entre 0.007–0.25% (Kwon et al., 2008).

Différentes stratégies visant à limiter la transmission d'HTLV-1 sont implémentées. Elles concernent le dépistage obligatoire d'HTLV-1 au niveau des poches de sang et les recommandations aux femmes enceintes pour qui ce dépistage obligatoire se révèle positif lors de la grossesse de ne pas allaiter. D'ailleurs, lorsque la mère n'allait pas son nourrisson, le risque de transmission est réduit à moins de 5% (Kashiwagi et al., 2004). Cependant, malgré ces mesures, le nombre de porteurs positifs n'a pas sensiblement diminué au Japon (Satake et al., 2016).

Enfin, de larges séries d'ATL et de HAM/TSP sont reportées non seulement en Iran mais encore au niveau d'Iraniens immigrés en Europe, aux Etats-Unis ou en Israël (Gabarre et al., 1993).

L'origine d'HTLV-1 sur le continent américain reste controversée. D'une part, les analyses phylogénétiques suggèrent qu'HTLV-1 a été introduit sur le continent américain lors de l'ère post-Colombienne au moment de l'immigration forcée des populations Africaines sub-saharienne. D'autre part, la détection d'HTLV-1 au niveau de momies au Chili et en Bolivie (d'après les travaux d'Orellana N, Mayo A, Otsuki K, Paulo AC. Pour référence: Program and Abstracts of the 14th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Retroviruses (Salvador) Salvador, Brazil: HTLV in pre-Columbian mummies in Bolivia) suggère que la présence d'HTLV-1 sur le continent Américain serait antérieure à l'ère post-Colombienne. Si les épisodes de migration des populations de l'Afrique vers les Amériques ou les Caraïbes ont conditionné la répartition actuelle d'HTLV-1, rien ne permet encore d'expliquer l'origine du virus au Japon.

#### 1.4 Pathologies associées à HTLV-1

HTLV-1 est l'agent étiologique d'une lymphoprolifération maligne des lymphocytes T ou ATL ou d'un désordre neurologique progressif du système nerveux central ou HAM/TSP ainsi que de plusieurs autres maladies associées.

### 1.4.1 ATL

En 1990, 15.6% des cas de cancers sont attribués à des agents infectieux variés : le virus de l'hépatite B (VHB), le virus de l'hépatite C (VHC), les papillomavirus humains (PVH) carcinogènes de type 16,18, 31 et 33, le virus de l'Epstein-Barr, l'Helicobacter, HTLV-1, les schistosomes et la grande douve du foie (*Fasciola hepatica*). En 1997, Pisani estime qu'HTLV-1 causerait à lui seul 1% des leucémies (Pisani et al., 1997).

Seuls 5 à 10% des individus infectés par HTLV-1 développent une ATL après une période de latence de 20 à 60 années (de Thé and Bomford, 1993). L'âge moyen de manifestation d'une ATL est de 55 ans. Au Japon, l'incidence des ATL est significativement plus importante chez les femmes (6,88 par 100 000 individus/année) en comparaison à l'incidence chez les hommes (2.29 par 100 000 individus/année) (Satake et al., 2015).

Il a longtemps été considéré que les malades qui développent des ATL sont contaminés lors de l'enfance (Murphy et al., 1989a). Cependant, Hermine et Gessain ont récemment décrit le cas d'un homme Français de 43 ans, dont les parents sont séronégatifs et qui aurait développé une ATL à la suite d'une transmission sexuelle d'HTLV-1 à partir d'une femme Camerounaise. Leur observation est supportée par le génotypage du virus obtenu sur deux prélèvements de PBMCs de cet homme qui révèlent une souche HTLV-1B, retrouvée seulement en Afrique centrale et particulièrement au Cameroun. Ceci suggère que des ATL peuvent aussi se développer après une transmission sexuelle à l'âge adulte (Sibon et al., 2015).

#### 1.4.1.1 Les sous-catégories de l'ATL

L'ATL se partage en 4 sous-catégories (Shimoyama, 1991). Le pronostic vital d'un patient varie en fonction de la forme de l'ATL par laquelle il est atteint. La définition des sous-catégories d'ATL tient compte de nombreux paramètres cliniques dont le pourcentage de lymphocytes T anormaux dans le sang périphérique, le taux de LDH, la calcémie ainsi que de l'étendue des tumeurs malignes sur différents organes. Le tableau 1 résume pour les quatre sous-catégories d'ATL leur fréquence relative par rapport au pourcentage total d'ATL, la médiane de survie (en mois) des patients qui en sont atteints et la symptomatologie relative.

<u>Sous-catégorie d'ATL</u>	<u>Fréquence (% ATL)</u>	<u>Médiane de Survie</u>	<u>Symptomatologie</u>
Indolente	5%	>24 mois	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Moins de 5% des lymphocytes T anormaux</li> <li>- Absence d'hyper-calcémie mais taux de LDH élevé</li> <li>- Présence de lésions au niveau de la peau causée par l'infiltration de cellules leucémiques</li> <li>- Absence ou anomalies minimales des ganglions lymphatiques</li> <li>- Chez 20% des patients ayant développé l'ATL indolente, il y a passage à la forme chronique</li> </ul>
Chronique	Concerne 20 % des ATL indolents	24.3 mois	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lymphocytose et augmentation du taux de cellules leucémiques (plus de 5% des lymphocytes T anormaux).</li> <li>- Forme assez proche de la forme indolente (absence d'hypercalcémie mais LDH élevé).</li> <li>- Présence de lymphadénopathies, hépatosplénomégalie.</li> </ul>
Aigue	55 %	6.2 mois	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Progression rapide de la maladie avec : lymphadénopathie systémique, hypercalcémie, lésions osseuses lytiques, hépatosplénomégalie, anomalies de la peau, taux élevé de LDH</li> <li>- Les symptômes cliniques incluent : fièvre, toux, malaise, dyspnée, soif, adénopathie</li> </ul>



Lymphomateuse	20 %	10.2 mois	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Moins de 1% de lymphocytes T anormaux dans le sang.</li> <li>- Adénopathie</li> <li>- Les patients sont immunodéprimés et sujets à des infections opportunistes virales, bactériennes, fongiques et parasitaires.</li> </ul>
---------------	------	-----------	---

Tableau 1: Les sous-catégories d'ATL. Ce tableau résume pour les quatre sous-catégories d'ATL leur fréquence relative par rapport au pourcentage total d'ATL, la médiane de survie (en mois) des patients qui en sont atteints et la symptomatologie relative (D'après (Shimoyama, 1991)).

Dans l'ATL, les lymphocytes T anormaux ont une morphologie particulière : noyau lobé, chromatine condensée, nucléoles petits ou absents. Plusieurs marqueurs d'activation, récepteurs de chimiokines et molécules d'adhérence sont surexprimés par les cellules infectées par HTLV-1. Ils incluent la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 (CD25) (Yamano et al., 2004), la molécule d'adhérence inter-cellulaire 1 (ICAM-1/CD54) (Fukudome et al., 1992) et le récepteur de la chimiokine 4 (CCR4/CD194) (Yoshie et al., 2002). Les lymphocytes T CCR4(+) infiltrent fréquemment la peau (Yoshie et al., 2002). Comme les populations CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> représentent en moyenne 90% des cellules infectées par HTLV-1 (Yamano et al., 2004), Yamano recommande la combinaison de CD25 et de CCR4 afin d'isoler les cellules infectées par HTLV-1 (Yamano et al., 2009).

Pour Bangham, CADM1 représente un marqueur supplémentaire de l'infection par HTLV-1. Il permet d'identifier les cellules infectées avec une meilleure sensibilité et spécificité en comparaison à CCR4 et ICAM-1. De plus, les lymphocytes T CADM1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> renferment 65% de la charge provirale du sang (la charge virale ou titre viral est le nombre de copies d'un virus (VIH, VHB...) dans un volume de fluide (sang, sperme, salive...) donné ou par rapport à un nombre de cellules donné) (Manivannan et al., 2016).

Les marqueurs cellulaires suivant permettent aussi de définir le phénotype des lymphocytes infectés : CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD7<sup>-</sup>, et CD8<sup>-</sup> et HLA-DR<sup>+</sup> (Juncà et al., 2014) .

Le diagnostic final de l'ATL n'est fait qu'après démonstration de l'intégration clonale d'HTLV-1 dans les cellules leucémiques (Juncà et al., 2014).

#### 1.4.1.2 Mécanismes de développement de l'ATL

Les mécanismes à l'origine du développement de l'ATL ne sont pas complètement élucidés.

Les propriétés oncogéniques d'HTLV-1 ont longtemps été associées à l'oncoprotéine transactivatrice Tax. Cependant, le rôle d'HBZ dans l'évolution de l'ATL est aussi de première importance.

Tout d'abord, Tax immortalise les lymphocytes T humains infectés (Mahieux and Gessain, 2007) et (Bellon et al., 2010). L'immortalisation cellulaire induite par Tax se fait à travers l'inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN : Tax interfère avec une multitude de mécanismes incluant BER (Base Excision Repair), NER (Nucleotide Excision Repair), le human mismatch repair (MMR), le non-homologous end joining (NHEJ) (Pour revue, (Curren et al., 2012)). Aussi, à travers la dérégulation de la transition G1/S de la progression du cycle cellulaire, Tax prévient la mort et favorise la prolifération des cellules infectées (Yang et al., 2011). Enfin, Tax conduit à la polyubiquitination de MDM2, un suppresseur de tumeur et à sa dégradation protéasomale (Oteiza and Mechti, 2011).

Au niveau immunitaire, Tax conduit à la sur-expression de diverses cytokines qui contribuent à la lymphoprolifération. Dans ce contexte, Good a montré que Tax conduit à l'activation du gène de l'IL-2 (Good et al., 1996). L'IL-2 contribue à l'ATL à travers la prolifération des cellules infectées. Silbermann a montré que Tax stimule la production de l'IL-13. L'IL-13 possède aussi des fonctions prolifératives et anti-apoptotiques à travers l'inhibition de la surveillance des tumeurs. (Silbermann et al., 2008). Grassmann a montré que Tax stimule la production de l'IL-15 :. L'expression de l'ARNm de l'IL-15 est augmentée d'un facteur de 3 dans les lymphocytes T infectés par HTLV-1 en comparaison aux lymphocytes T en provenance d'individus sains (Grassmann et al., 2005). Mizuguchi a aussi démontré que Tax stimule la production de l'IL-21 ainsi que son récepteur ce qui favorise la croissance et la survie des lymphocytes T infectés (Mizuguchi et al., 2009). Notons finalement que l'expression de *tax* est souvent réprimée dans les cellules de patients ATL du fait du silencing épigénétique du 5'LTR (Takeda et al., 2004) ce qui suggère l'importance de Tax dans l'initiation du processus de l'ATL mais aussi l'importance de sa suppression lors de l'infection par HTLV-1. Ici la suppression de l'expression de Tax interfère avec l'efficacité de la réponse immune et contribue à ralentir la pathogenèse, la genèse des tumeurs

et l'inflammation. C'est ce qui expliquerait pourquoi le développement de l'ATL peut mettre plusieurs décennies à partir du moment de la primo-infection.

Ensuite, HBZ est également responsable de l'immortalisation des lymphocytes T : l'ARNm d'HBZ permet la prolifération des lymphocytes T humains. Au contraire, la suppression de la transcription du gène *hbz* inhibe la prolifération des cellules ATL (Satou et al., 2006). La revue de (Zhao, 2016) résume les fonctions oncogéniques d'HBZ lors de l'ATL. D'autres études reportent que HBZ est impliqué dans la suppression immunitaire à travers l'augmentation de la signalisation via le récepteur du TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor-beta) et la suppression de la production de cytokines Th1 (Sugata et al., 2012) et (Zhao et al., 2011).

Au niveau immunitaire, l'ATL se caractérise par une suppression immunitaire. Les lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre HTLV-1 sont anergiques : même stimulés, ils sont à la fois incapables de proliférer et de produire l'IFN- $\gamma$ . Cette inhibition des réponses des lymphocytes T accélère d'ailleurs la lymphoprolifération (Kannagi et al., 2012). De même, au cours de l'ATL, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectés expriment souvent Foxp3. Ceci correspond au phénotype des lymphocytes T régulateurs (Kannagi et al., 2012). Ce fonctionnement des lymphocytes T en Treg contribue à la suppression immunitaire générale qui est observée lors de l'ATL (Pour revue, (Kannagi et al., 2012)). De plus, les lymphocytes T infectés sont déficients en l'expression de CD40L. Ils contribuent à la suppression immunitaire à travers leur incapacité à être activés par les DCs (Makino et al., 2001). Enfin, comme les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont aussi infectés, ils sont la cible de leur propre destruction ce qui diminue le nombre de lymphocytes cytotoxiques CD8<sup>+</sup> qui sont susceptibles de combattre l'infection (Hanon et al., 2000).

Les cellules présentatrices d'antigènes qui constituent probablement les premières cellules à reconnaître HTLV-1 lors de la primo-infection contribuent encore au mécanisme de suppression immunitaire lors de l'ATL. Le chapitre 4 qui traitera du détournement des fonctions des DCs par les virus abordera la contribution des DCs au développement de l'ATL.

#### 1.4.2 HAM/TSP

En 1985, Antoine Gessain et ses collaborateurs ont mis en évidence la présence d'anticorps anti-HTLV-1 chez un groupe de patients atteints d'un désordre neurologique progressif, la paraparésie spastique tropicale (TSP pour Tropical Spastic Paraparesis), en Martinique (Gessain et al., 1985). Une année plus tard, Osame reportait l'existence d'anticorps anti-HTLV-1 spécifiques chez des

patients japonais atteints de myélopathie (HAM pour HTLV-1 associated myelopathy) (Osame et al., 1986).

Des études ultérieures ne tardèrent pas à révéler que l'HAM et la TSP sont en réalité la même pathologie dont l'agent étiologique serait HTLV-1. Les symptômes majeurs de l'HAM/TSP incluent la spasticité et la faiblesse des muscles au niveau des membres inférieurs et le dysfonctionnement vésical.

La période de latence pour le développement de la paraparésie peut être plus courte que celle de l'ATL: elle peut durer quelques mois ou s'étendre sur plusieurs dizaines d'années (Osame et al., 1990). Les femmes séropositives à HTLV-1 sont trois fois plus enclines à développer la paraparésie que les hommes. Aussi, l'âge moyen de survenue de cette pathologie est de 43 ans (Uchiyama et al., 1977).

En 2002, Nagai a démontré l'existence d'une corrélation entre charge provirale élevée des PBMCs chez les patients atteints d'HAM/TSP et l'étendue des dommages du système nerveux central (Nagai et al., 1998). Cependant, les connaissances actuelles montrent que la charge provirale constitue un mauvais indicateur pour prédire le devenir des patients: des porteurs asymptomatiques conservent parfois des charges provirales élevées sans jamais développer des symptômes cliniques associés à l'infection par HTLV-1 (Martins et al., 2017).

#### 1.4.2.1 Mécanismes moléculaires de développement de l'HAM/TSP

Différentes hypothèses expliquent les dommages neurologiques de l'HAM/TSP. Selon une première hypothèse, HTLV-1 envahirait les populations cellulaires du système nerveux central comme les neurones et les cellules gliales. Ici, la protéine transactivatrice Tax "hyper-stimulerait" le système immunitaire: des anticorps anti-Tax interagiraient avec des protéines neuronales comme la protéine A1 causant une inflammation au niveau du système nerveux central (Levin et al., 2002). Cette inflammation induit la dysfonction des oligodendrocytes et la démyélinisation des neurones (Alefantis et al., 2005). Des hybridations *in situ* entreprises par Lehky ont mis en évidence l'ARN d'HTLV-1 dans la moelle épinière ainsi que dans des sections du cerebellum. De plus, des analyses histologiques ont démontré que les astrocytes sont également infectés (Lehky et al., 1995).

Pour Moore, Matsui et Kruoda, ce seraient les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ présents dans les échantillons de moelle épinière de patients HAM/TSP qui causeraient les dommages du SNC

(Moore et al., 1989) en raison de leur activité cytotoxique élevée (Matsui and Kuroda, 1997). En effet, tous les patients HAM/TSP ont d'importantes quantités de lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre les protéines Tax ou Env d'HTLV-1 aussi bien dans le sang périphérique que dans le système nerveux central. Il en est de même pour les lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre la polymérase et HBZ qui sont également des antigènes immunogènes (Pour revue, (Kannagi et al., 2012). D'ailleurs, une autre expérience qui a fait appel à l'imagerie par résonance magnétique a permis de constater de nombreuses lésions au niveau de la moelle épinière d'un patient HAM/TSP envahies par des lymphocytes T CD8+ (Levin and Jacobson, 1997).

Contrairement à l'immunosuppression caractéristique de l'ATL, les réponses immunitaires inflammatoires sont caractéristiques de l'HAM/TSP.

Lors de l'HAM/TSP, l'infection par HTLV-1 activerait la transcription de gènes cellulaires qui induiraient la sécrétion de cytokines inflammatoires. D'ailleurs, des marquages immunohistochimiques d'échantillons de moelle épinière de patients HAM/TSP autopsiés ont permis de constater l'expression de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  dans les macrophages infiltrés, dans la microglie et les astrocytes des lésions inflammatoires (Umehara et al., 1994). De même, les lymphocytes T cytotoxiques attaquent les cellules infectées et secrètent également des cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-16), des chimiokines (MIP-1 alpha, MIP-1 beta), des métalloprotéinases (métalloprotéinase-9), une large famille d'endopeptidases Zn<sup>2+</sup> qui dégradent les protéines de la matrice en endommageant directement les cellules (Biddison et al., 1997). Récemment, Yamano et Coler-Reilly ont montré que la chimiokine CXCL10 est impliquée dans le maintien de l'inflammation du SNC. Les astrocytes seraient les cellules productrices de CXCL10 (Yamano and Coler-Reilly, 2017).

En 2012, Tattermusch et al., avaient comparé les profils transcriptomiques sanguins (leucocytes) de porteurs asymptomatiques d'HTLV-1, de malades atteints d'HAM/TSP et de sujets séronégatifs pour HTLV-1 (sujets contrôles) (Tattermusch et al., 2012). Tattermusch a montré que la présence de l'HAM/TSP est associée à la surexpression de certains ISGs. Cette signature corrèle aussi positivement à la sévérité de la maladie et est absente chez les porteurs d'HTLV-1 asymptomatiques. Ce qui reste méconnu est de savoir si cette signature contribue au dommage tissulaire de l'HAM/TSP ou, au contraire, si elle serait conséquence à l'inflammation qui l'accompagne.

### 1.4.3 Autres pathologies associées à HTLV-1

La liste des maladies associées à HTLV-1 est étendue à :

Maladie	Symptomatologie
Dermatite associée à HTLV-1 (Alvarez et al., 2016)	<ul style="list-style-type: none"><li>- Eczéma avec des surinfections à <i>Staphylococcus aureus</i> ou aux streptococcus bêta-hémolytiques.</li></ul>
Uvéites (Terada et al., 2017)	<ul style="list-style-type: none"><li>- L'infection à HTLV-1 dans les régions endémiques est associée à des uvéites, kératoconjunctivites et des kératites intersticielles.</li><li>- Leur survenue en chronique chez les enfants peut résulter en une dégénérescence de la rétine.</li></ul>
Polymyosite (Ozden et al., 2004)	<ul style="list-style-type: none"><li>- Cette pathologie est liée à la migration tissulaire des lymphocytes T CD4+ et des lymphocytes cytotoxiques infectés par HTLV-1</li><li>- Des lymphocytes T cytotoxiques anti-Tax sont recrutés au niveau des tissus musculaires enflammés des patients infectés par HTLV-1</li></ul>

Tableau 2 : Autres pathologies associées à HTLV-1 : la dermatite, les lésions oculaires ou la polymyosite s'ajoutent à l'HAM/TSP et à l'ATL comme pathologies associées à HTLV-1.

## 1.5 Trois voies de transmission inter-humaines

### 1.5.1 Transmission verticale par allaitement

Il s'agit de la principale voie de transmission d'HTLV-1 dans les régions endémiques. 20% des nourrissons allaités sur une durée supérieure à 6 mois sont à risque d'être infectés par HTLV-1 (Moriuchi et al., 2013). Environ 5% des individus qui sont infectés à la suite d'une transmission verticale par allaitement développent l'ATL (Kakuda et al., 2002).

Chez le nourrisson, l'infection par HTLV-1 se fait lors de l'allaitement prolongé au-delà de 6 mois à la suite de l'ingestion de lait contenant des cellules contaminées (Takezaki et al., 1997). Southern et Southern ont montré que les lymphocytes T, les monocytes, les macrophages et les cellules épithéliales du lait maternel hébergent le provirus (Southern and Southern, 1998). La charge provirale du lait maternel est corrélée avec le risque de transmission verticale : l'incidence de

l'infection par HTLV-1 est de 4.7/1000 individus/mois lorsque la charge provirale dans le lait est inférieure à 0.18%. Cependant l'incidence de l'infection par HTLV-1 atteint 28.7/1000 individus/mois lorsque la charge provirale dans le lait maternel est supérieure à 15 % (Li et al., 2004). Néanmoins, la transmission d'HTLV-1 peut avoir lieu chez les enfants ayant reçu du lait au niveau duquel la charge provirale est faible. Ceci peut être lié au fait que le nombre de cellules dans le lait maternel varie le long de la période pendant laquelle une femme allaite. Il en est conséquemment de même pour la charge virale (Jain et al., 1991).

Trois méthodes sont appliquées pour limiter la transmission verticale par allaitement : la première est la limitation de la durée de l'allaitement à moins de six mois. La seconde méthode est l'extraction du lait maternel puis sa congélation à -20°C sur une durée supérieure à 12 heures. Cette seconde méthode permet la destruction des cellules infectées par HTLV-1 *in vitro* (pour revue (Carneiro-Proietti et al., 2014)). La troisième méthode consiste à remplacer l'allaitement des nourrissons par le lait en bouteille (Nerome et al., 2014).

Pique et Jones ont proposé un modèle illustrant la transmission de l'infection à la suite de l'ingestion du lait maternel contaminé (Pique and Jones, 2012). Dans leur modèle, les cellules infectées par HTLV-1 ainsi que les virions qu'elles produisent dans le lait traversent la muqueuse orale ou gastro-intestinale. Le passage des cellules infectées se ferait de préférence au niveau des brèches des muqueuses digestives. Les cellules infectées peuvent s'attacher sur le pôle apical des cellules épithéliales et les infecter. Les particules virales nouvellement synthétisés bourgeonnent au niveau du pôle basal de ces cellules (Pique and Jones, 2012).

Enfin, la transcytose d'HTLV-1, décrite par Martin-Latil, constitue un mécanisme de transport transcellulaire que peuvent emprunter les virions produits par les lymphocytes T infectés pour la traversée de la barrière épithéliale (Martin-Latil et al., 2012). Ces virions qui migrent par transcytose peuvent infecter les lymphocytes T ou B ou les DCs situés sous la barrière épithéliale. En plus de la transcytose, les lymphocytes infectés peuvent aussi infecter les DCs et les lymphocytes T. Pour cela, les lymphocytes infectés traversent, en premier, la couche de mucus et passent, ensuite, entre les entérocytes pour atteindre la *lamina propria* au niveau de laquelle DCs et lymphocytes T sont localisés. L'étude de Martin-Latil (Martin-Latil et al., 2012) suggère que l'infection des entérocytes n'a pas lieu (Pour revue (Percher et al., 2016)).

### 1.5.2 Transmission sexuelle

Les rapports sexuels non protégés, la présence des ulcères génitaux, les antécédants de MSTs (maladies sexuellement transmissibles) et le nombre élevé de partenaires sexuels sont des facteurs de risque pour la transmission sexuelle d'HTLV-1 (Murphy et al., 1989b). Chez un individu chroniquement infecté, les cellules infectées contenues dans le sperme ou les sécrétions cervico-vaginales sont encore méconnues. Comme dans le cadre d'une transmission par voie digestive, la transmission sexuelle requiert qu'HTLV-1 traverse les barrières muqueuses des tractus génitaux. Une fois la barrière muqueuse traversée, le virus pourrait infecter les DCs, les macrophages et les lymphocytes T.

Une étude a récemment été menée à Salvador, la ville du Brésil où la prévalence d'HTLV-1 est la plus élevée : 1.45 % de la population générale. Cette étude a montré, à travers trois arguments, que c'est la transmission sexuelle qui contribue à l'augmentation de la prévalence d'HTLV-1 au niveau de la population générale : le premier argument est l'association robuste entre l'infection par la syphilis (une MST) et l'infection par HTLV-1, le second argument est la faible prévalence d'HTLV-1 au niveau des enfants et des adolescents de moins de 17 ans, et le troisième argument est, contrairement au précédent, l'augmentation de la prévalence de l'infection par HTLV-1 chez les groupes des individus adultes (Nunes et al., 2017).

Enfin, une étude récente en Argentine a montré que la prévalence d'HTLV-1 entre les membres d'une famille où des cas d'infections sont répertoriés est de 31.52%. La prévalence élevée serait à la fois causée ici par la transmission verticale par allaitement en plus de la transmission sexuelle entre les époux (Frutos et al., 2017).

### 1.5.3 Transmission horizontale sanguine d'HTLV-1

HTLV-1 est aussi transmis à la suite d'une transfusion de produits sanguins contaminés. La transmission sanguine se fait souvent entre toxicomanes lors du partage des seringues.

D'après Osame, environ 20% des individus infectés ayant développé l'HAM/TSP se rappellent avoir subi une transfusion sanguine contre seulement 3% des individus séronégatifs de la population contrôle de l'étude (Osame et al., 1990). Contrairement à la transmission d'HTLV-1 par voie sexuelle ou par allaitement, la transmission sanguine ne requiert pas la traversée d'une barrière muqueuse. Ainsi, la transmission virale selon cette voie serait la plus efficace et pourrait conduire à plus de 44% de séroconversion rien qu'après une exposition unique à des cellules



sanguines infectées par HTLV-1 (Manns et al., 1992). Récemment, Sobata a estimé que 90000 cellules infectées du sang sont suffisantes pour établir la transmission par transfusion sanguine d'HTLV-1 (Sobata et al., 2015). La transmission sanguine constitue un risque majeur pour le développement de l'HAM/TSP (Gessain and Mahieux, 2012).

Enfin, Cook a récemment décrit trois cas de transmission d'HTLV-1 à la suite de transplantation d'organes (deux reins et un foie). Les greffons sont prélevés sur le cadavre d'une femme décédée et infectée par HTLV-1 mais dont le status sérologique était inconnu au moment de la transplantation des trois greffés. Ici, les anticorps anti-HTLV-1 sont détectés au 16<sup>ème</sup> jour de la date de la greffe chez deux transplantés et au 39<sup>ème</sup> jour chez le troisième transplanté. Chez ces trois patients, une thérapie anti-rétrovirale (association d'un inhibiteur de la transcriptase inverse et d'un inhibiteur de l'intégrase) fut initiée. Néanmoins, elle a été incapable de limiter l'augmentation de la charge provirale chez les trois patients (Cook et al., 2016).

1.6 Tropisme viral

1.7 Récepteurs d'entrée virale à HTLV-1

1.8 Capacité migratoire des cellules infectées par HTLV-1

1.9 Mécanismes de transmission inter-cellulaires d'HTLV-1

Les chapitres 1.6 à 1.9 sont développés dans la revue parue dans médecine/sciences dans son numéro de Juin 2015 et figurant ci-après (Rizkallah et al., 2015).

## 2 Revue Médecine/Sciences

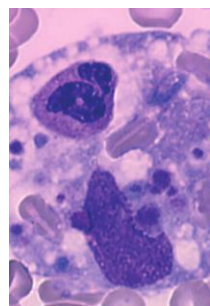


médecine/sciences 2015 ; 31 : 629-37

► Le rétrovirus HTLV-1 est l'agent étiologique de la leucémie à cellules T de l'adulte (ATLL) et de la paraparésie spastique tropicale, une myélopathie associée à HTLV-1 (HAM/TSP). *In vivo*, le provirus est principalement détecté dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Il est aussi, mais moins fréquemment, retrouvé dans des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, des lymphocytes B, des monocytes, des macrophages, des cellules dendritiques et d'autres cellules non lymphoïdes. Le virus HTLV-1 libre étant faiblement infectieux, sa transmission dépend de contacts inter-cellulaires. Ce mode de transmission repose sur la capacité accrue des cellules infectées à migrer, une fonction assurée par l'activateur transcriptionnel viral Tax *via* la réorganisation du cytosquelette. La transmission intercellulaire de HTLV-1 repose sur trois voies moléculaires non exclusives. Tout d'abord, la synapse virologique (VS), similaire à la synapse immune, définit un espace de contact spécialisé et polarisé entre la cellule infectée et la cellule cible, à l'intérieur duquel le virus est transmis. Ce mécanisme dépend également de la protéine Tax qui contrôle le réarrangement du cytosquelette responsable de la polarisation de la cellule infectée. Le deuxième mode de transmission virale dépend du transfert d'une structure extracellulaire adhésive dans laquelle s'accumulent les virions. Ce biofilm viral est enrichi en protéines de la matrice extra-cellulaire et en protéines d'adhésion de la cellule hôte, dont l'expression est augmentée par la protéine Tax. Enfin, le troisième mode de transmission du virus utilise des extensions de la membrane des cellules infectées qui forment des conduits intercellulaires, et permettent le transfert des protéines de HTLV-1 aux cellules cibles, mais aussi la stabilisation des contacts intercellulaires. L'objectif de cette revue est de détailler les mécanismes moléculaires de ces trois voies de transmission de HTLV-1. ◀

### Transmission intercellulaire de HTLV-1 Des mécanismes loin d'être complètement élucidés

Gerges Rizkallah, Renaud Mahieux, Hélène Dutartre



Équipe oncogénèse rétrovirale ;  
équipe labellisée Ligue nationale  
contre le cancer ;  
centre international de  
recherche en infectiologie,  
Inserm U1111-CNRS UMR5308,  
Lyon, France ; École normale  
supérieure de Lyon, 46, allée  
d'Italie, 69007 Lyon, France ;  
université Lyon 1, Lyon, 69364  
Cedex 07, France.  
[helene.dutartre@ens-lyon.fr](mailto:helene.dutartre@ens-lyon.fr)

Le rétrovirus oncogène T-lymphotrope de type 1 humain (HTLV-1, *human T-lymphotropic virus type 1*) est endémique au Japon, en Afrique subsaharienne, dans la région Caraïbe et en Amérique du Sud. Il infecte 5 à 10 millions d'individus dans le monde [1]. Il est l'agent étiologique de l'ATLL ou leucémie à cellules T de l'adulte, et de la TSP/HAM ou paraparésie spastique tropicale/myélopathie associée à HTLV-1. L'ATLL, caractérisée par l'intégration clonale du provirus dans les cellules tumorales, est une lymphoprolifération maligne de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ayant un phénotype activé. Cliniquement, quatre formes d'ATLL sont identifiées : indolente, chronique, lymphomateuse et aiguë. Les formes indolente et chronique peuvent progresser vers la forme aiguë, cette dernière étant la plus agressive, avec une médiane de survie des patients de 6 mois. La HAM/TSP est, quant à elle, une maladie neuro-inflammatoire chronique [2] dont l'évolution aboutit à une invalidation progressive des fonctions motrices. Elle est cliniquement caractérisée par une spasticité<sup>1</sup> et une faiblesse musculaire des membres inférieurs, et par un dysfonctionnement de l'appareil urinaire. Ainsi, dix ans après le diagnostic, près de 50 % des patients sont incapables de se déplacer de façon autonome. Ces deux pathologies ne se développent qu'après une période de latence clinique de plusieurs décennies suivant la primo-infection par le virus.

Le génome d'HTLV-1 est encapsidé dans une structure formée par la protéine virale p19, codée par le gène viral *gag*, et enveloppé d'une membrane contenant une glycoprotéine de surface, la gp46 (ou *surface*

<sup>1</sup> La spasticité est une augmentation du réflexe tonique d'étirement, c'est-à-dire une contraction musculaire réflexe exagérée. Le membre spastique perd de sa souplesse et de sa mobilité.



Type cellulaire	Infection par HTLV-1	Méthode de détection	
Lymphocytes	CD8 <sup>+</sup>	Démontrée <i>ex vivo</i> , à partir de cellules mononucléées (CMN) sanguines de patients TSP/HAM cultivées <i>in vitro</i> [46]	Expression de la protéine régulatrice Tax (cytométrie en flux et ARNm) Présence de l'ADN proviral (PCR)
	CD4 <sup>+</sup>	Démontrée <i>ex vivo</i> , à partir de CMN de patients ATLL cultivées <i>in vitro</i> [46]	Expression de la protéine régulatrice Tax (cytométrie en flux et ARNm) Présence de l'ADN proviral (PCR)
	B	Démontrée <i>ex vivo</i> , à partir de la purification des lymphocytes B circulants de patients TSP/HAM, ATLL et de porteurs asymptomatiques [46]	Présence de l'ADN proviral (PCR) Présence de la protéine de capsid p19 (cytométrie en flux)
Monocytes/ macrophages	Monocytes	Démontrée <i>ex vivo</i> , à partir de CMN de porteurs asymptomatiques [7]	Présence du provirus (PCR)
	Macrophages	Démontrée <i>in vitro</i> , après infection de monocytes [6]. L'infection induit l'apoptose des monocytes Démontrée <i>ex vivo</i> , à partir de la purification des macrophages circulants de patients TSP/HAM, ATLL et de porteurs asymptomatiques [47]	Présence de l'ADN rétrotranscrit mais non intégré (PCR) Présence de l'ADN proviral (PCR)
Cellules dendritiques	Myéloïdes (my)	Démontrée <i>ex vivo</i> , dans des cellules dendritiques de patients TSP/HAM [46]. <i>In vitro</i> après infection des myDC purifiées à partir de CMN de donneurs de sang non infectés [8]	Présence d'acides nucléiques viraux (hybridation <i>in situ</i> ) Présence des protéines de la matrice MA et régulatrice Tax (cytométrie en flux)
	Plasmacytoïdes (p)	Démontrée <i>ex vivo</i> , à partir de CMN issues de patients ATLL [8] Démontrée <i>in vitro</i> , après infection de pDC purifiées à partir de CMN de donneurs de sang non infectés [8]	Présence du provirus (PCR). Présence des protéines de la matrice MA et régulatrice Tax (cytométrie en flux)
			Production de particules virales (ELISA p19 dans les surnageants de culture) Expression de la protéine régulatrice Tax (cytométrie en flux)
	Différenciées <i>in vitro</i> à partir de monocytes	Démontrée <i>in vitro</i> , après infection avec du virus libre [8] ou des lignées chroniquement infectées [48]	Production de particules virales. Expression de la protéine régulatrice Tax (cytométrie en flux). Expression de la protéine gag p19 (cytométrie en flux et immunofluorescence).
Tissus	Tissu du cervix	Démontrée <i>ex vivo</i> sur du tissu du cervix [49] Démontrée <i>ex vivo</i> sur des sécrétions vaginales [50]	Présence du provirus (PCR) Présence du provirus (PCR)
	Glandes sudoripares	Démontrée <i>ex vivo</i> sur des biopsies de peau de porteurs asymptomatiques [51]	Présence du provirus (nested PCR)
	Biopsies mammaires	Démontrée <i>in vitro</i> après infection de cellules basales épithéliales primaires avec des lignées lymphocytaires infectées [52]	Présence du provirus (PCR et immunohistochimie)
	Tissu du système nerveux central	Démontrée <i>ex vivo</i> sur du matériel d'autopsie : cervelet et moelle épinière de patients TSP/HAM [53]	Présence des ARNm viraux (hybridation <i>in situ</i> )

Tableau I. Différents types cellulaires infectés par HTLV-1.



unit - SU), liée à une glycoprotéine transmembranaire, la gp21 (ou *transmembrane unit* - TM). Les protéines gp46 et gp21 sont codées par le gène viral *env*. C'est la protéine gp46 qui assure la fixation, puis l'entrée du virus dans les cellules cibles. La transmission d'HTLV-1 d'un individu à un autre suit l'une des trois voies suivantes [3] : transmission verticale lors d'un allaitement prolongé au-delà de six mois ; transmission sexuelle préférentiellement de l'homme vers la femme ; transmission par des produits sanguins contenant des cellules infectées.

L'objectif de cette revue est de documenter les mécanismes moléculaires permettant la transmission d'HTLV-1.

### Tropisme viral de HTLV-1

HTLV-1 a été détecté pour la première fois dans les cellules d'un patient atteint d'un lymphome T cutané initialement diagnostiqué comme mycosis fongoides, ainsi que dans deux lignées dérivées des cellules tumorales de ce même patient. La recherche du génome viral intégré (provirus) dans l'ADN génomique de différentes populations cellulaires a permis de définir le tropisme du virus (*Tableau I*). *In vivo*, le provirus HTLV-1 est très majoritairement détecté dans les lymphocytes T mémoires CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>. Des analyses *ex vivo* ont permis de montrer que le provirus est également présent dans les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, les lymphocytes B, les monocytes, les cellules dendritiques myéloïdes, les cellules dendritiques plasmacytoïdes et les macrophages. Des ARN messagers viraux ont été détectés dans des astrocytes au sein de biopsies du cervelet et de la moelle épinière de patients atteints de TSP/HAM.

Les modèles actuels suggèrent que l'infection virale induit d'abord une étape d'immortalisation au cours de laquelle les cellules infectées se divisent de façon continue sous l'influence des effets pléiotropes de la protéine transactivatrice Tax. Cette étape requiert la présence de cytokines telles que l'interleukine (IL)-2. Par la suite, cette immortalisation conduit à la transformation des cellules à l'origine de la leucémie. L'expression de la protéine Tax est plus rarement détectée dans les cellules transformées provenant de patients souffrant de leucémie T de l'adulte (ATLL). Le virus induit une prolifération clonale, ce qui permet d'augmenter la charge virale en l'absence de toute étape de transcription inverse ou de production de virions. Ainsi, chez un individu infecté, asymptomatique ou malade, plusieurs clones de lymphocytes T infectés sont détectés, chacun de ces clones résultant d'un événement d'intégration virale. Mais le développement d'une leucémie sera la conséquence de la prolifération d'un seul clone, dans lequel un événement transformant sera survenu [4]. *In vivo* et *ex vivo*, ni les ARN messagers viraux, ni les protéines virales, ni le virus libre dans le plasma ne sont aisément détectés. Ceci suggère la mise en place d'une réponse immunitaire de l'hôte à l'origine de la restriction de l'expression du virus [5].

*In vitro*, HTLV-1 infecte de façon productive les lignées de cellules lymphoïdes et les cellules dendritiques dérivées de monocytes humains (pour une revue [3]). Bien que susceptible à l'infection, les monocytes eux-mêmes ne sont pas permissifs pour la réplication virale. Leur exposition au virus conduit en effet à leur mort par apoptose [6]. Pourtant, on peut retrouver des provirus intégrés dans le génome des monocytes de patients infectés [7].

Les cellules dendritiques, quant à elles, sont capables de transmettre le virus aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> *in vitro* [8]. Ces cellules, qu'elles soient muco-sales ou sanguines, pourraient ainsi être les premières cellules infectées lors d'une primo-infection *in vivo*, et elles pourraient transmettre HTLV-1 aux lymphocytes après leur migration vers les organes lymphoïdes.

### Trois molécules impliquées dans l'entrée virale

La capacité du virus HTLV-1 à infecter de nombreuses cellules humaines et animales *in vitro* a longtemps constitué un obstacle à l'identification de ses récepteurs. Plusieurs molécules sont impliquées dans la fixation du virus aux cellules cibles, puis dans l'entrée du virus dans les cellules (*Tableau II*) (pour revue voir [9]). La fixation des particules virales sur les cellules cibles dépend de l'expression de protéoglycanes à héparanes sulfates (HSPG), qui constituent un premier facteur d'attachement. GLUT-1, un transporteur du glucose fortement exprimé par les cellules T activées, est ensuite impliqué dans l'entrée du virus. Le niveau d'expression de GLUT-1 à la surface des cellules n'est cependant pas corrélé au niveau de fixation de la protéine virale d'enveloppe SU [10], suggérant que GLUT-1 intervient dans les événements tardifs de l'entrée (étape de fusion) [11]. Une troisième molécule contribue à l'entrée du virus. Il s'agit de la neuropiline-1 (NRP-1 ou BDCA4 [*blood dendritic cell antigen 4*], CD304 ou VEGF165R [*vascular endothelial growth factor isoform 165 receptor*]). Son expression *in vivo* est limitée aux lymphocytes T activés, aux cellules dendritiques, aux cellules endothéliales ainsi qu'à certaines cellules tumorales [12]. NRP-1 est en effet exprimée dans la très grande majorité des cellules transformées, dont les lignées de laboratoires [13], ce qui corrèle avec le tropisme de HTLV-1 *in vitro*. C'est un récepteur de l'isoforme A du VEGF (VEGF165), qui joue un rôle en particulier dans la survie des cellules tumorales [14].

L'entrée productive du virus requiert des interactions séquentielles entre les protéines d'enveloppe virales et ces trois molécules [9]. Selon le modèle proposé par Pique et Jones [3], les HSPG interagissent avec SU, permettant l'attachement initial des virions et leur concentration à la surface cellulaire. Les HSPG assurent par ailleurs le recrutement de NRP-1. Une interaction s'établit ensuite entre la région 90-94 de SU et le domaine « b » de NRP-1<sup>2</sup>, stabilisée par les HSPG. Un second changement de conformation permet l'interaction de la tyrosine 114 de la SU avec GLUT-

<sup>2</sup> NRP-1 présente trois domaines extracellulaires (a, b et c), un domaine transmembranaire et un domaine intracytoplasmique court. Le domaine b est capable de lier le VEGF mais également les chaînes d'héparanes sulfates des HSPG.



Récepteurs de HTLV-1	Localisation cellulaire	Rôle dans l'entrée virale	Exception
GLUT-1 ou transporteur du glucose -1	Ubiquitaire dans toutes les lignées de laboratoires Surexprimé après activation des cellules ou dans les cellules en prolifération	Événements tardifs de l'entrée tels que la fusion [11]	Les lignées de glioblastome/astrogliome n'expriment pas GLUT-1 mais sont sensibles à l'infection par HTLV-1
BDCA-4 ou NRP-1 ou CD304 ou VEGF165R	<i>In vivo</i> : lymphocytes T activés, cellules dendritiques (DC), cellules endothéliales et certaines lignées de cellules tumorales <i>In vitro</i> : expression dans quasiment toutes les lignées dont particulièrement les cellules dendritiques	Liaison de la protéine Env de HTLV-1 (SU) à la surface de la cellule cible [54], formation de syncytiums [55]	Infection possible en présence d'anticorps bloquant l'interaction entre HTLV-1 et NRP-1 dans les cellules dendritiques [15]
Protéoglycanes à héparanes sulfates (HSPG et syndécan 1 et 2)	Toutes les cellules. Les HSPG sont un composant de la matrice extracellulaire	Facteurs d'attachement et de concentration du virion à la surface de la cellule cible Assurent le recrutement de NRP-1 [9]	Les cellules T CD4 <sup>+</sup> non activées expriment peu ou pas de HSPG. Infection possible en présence d'anticorps bloquant l'interaction entre les HSPG et HTLV-1 dans les cellules dendritiques [15]
DC-SIGN	Cellules dendritiques, cellules dendritiques dérivant de monocytes (MDDC), cellules dendritiques myéloïdes et lignées cellulaires B	Facteur d'attachement et de concentration du virion à la membrane des cellules dendritiques [15] également impliqué dans la transmission du virus des cellules dendritiques aux lymphocytes T	Expression restreinte à quelques sous-types de cellules dendritiques, mais pas d'expression dans les pDC

**Tableau II. Récepteurs cellulaires de HTLV-1.** DC : cellules dendritiques.

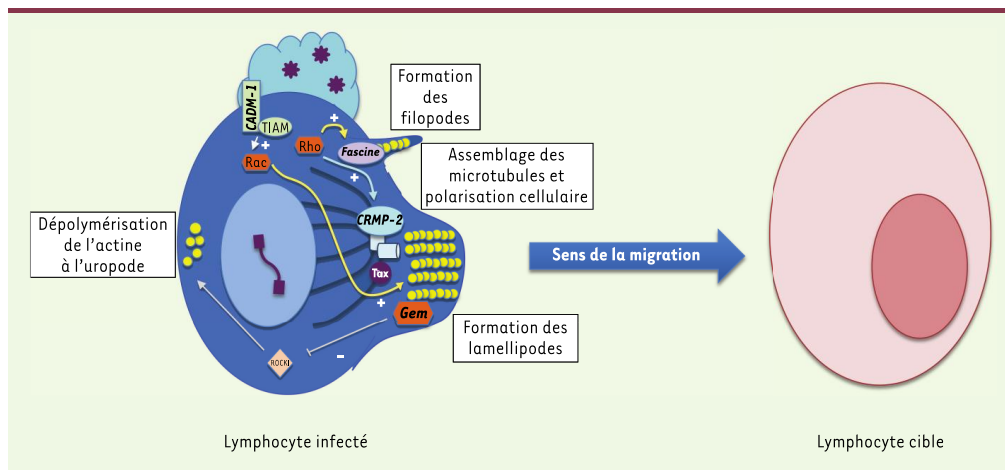
l, conduisant alors à la fusion des membranes virales et cellulaires. Ce modèle a été validé dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, mais n'est peut être pas généralisable à toutes les cellules primaires. En particulier, l'infection des cellules dendritiques dérivant de monocytes reste possible en présence d'anticorps bloquant l'interaction de SU avec les HSPG ou NRP-1. Dans ce cas, la fixation du virus pourrait dépendre de l'expression de DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*), une lectine de type C exprimée par les cellules dendritiques [15]. De même, bien que n'exprimant pas GLUT-1, les cellules de la lignée U87 (provenant d'astrocytes tumoraux) sont infectables par HTLV-1 [16]. Leur infection dépendrait de l'expression de NRP-1 [17]. Ces deux exemples suggèrent l'existence possible d'autres récepteurs spécifiques de certains types cellulaires cibles de HTLV-1, ou une utilisation alternative des récepteurs en fonction des types cellulaires.

### Une capacité accrue des cellules infectées à migrer

Bien que certaines études aient décrit l'infection de lymphocytes T ou de lymphocytes B par du virus libre *in vitro*, aucun cas humain d'infection

n'a été observé après une transfusion de produits sanguins acellulaires. *In vitro*, et à l'exception des cellules dendritiques [8], l'infection des cellules cibles n'est possible qu'après un contact étroit avec une cellule infectée de façon productive [18], ce qui permet d'augmenter d'un facteur 10 000 l'efficacité de l'infection [19].

Ce contact cellule-cellule, parfois appelé « conjugué », est associé à plusieurs événements : migration des cellules infectées vers leur cible, formation d'une synapse, polarisation du centre organisateur des microtubules (*microtubule organizing center*, MTOC) dans la cellule infectée, et transfert polarisé et localisé du virus au point de contact. Ces événements dépendent tous d'une réorganisation du cytosquelette qui fait intervenir les réseaux d'actine et de tubuline dans la cellule infectée [19, 20]. Ce phénomène est contrôlé par la protéine virale Tax, qui colocalise partiellement avec le MTOC [20]. L'infection par HTLV-1, ou l'expression de la protéine Tax elle-même, modifie l'expression de plusieurs protéines



**Figure 1.** Modèle des mécanismes moléculaires conduisant à la migration des lymphocytes induite par l'infection HTLV-1 et la protéine Tax. La migration des cellules repose sur plusieurs mécanismes : la formation de filopodes, l'assemblage des microtubules et la polarisation de la cellule dans le sens de la migration, la formation de lamellipodes et, enfin, la dépolymérisation de l'actine au pôle opposé à la migration. Plusieurs cascades de signalisation impliquant des protéines G de la famille Rho/Rac (représentées en orange) sont activées afin de coordonner la migration et la polymérisation/dépolymérisation de l'actine (représentée en jaune) ou des microtubules (représentés en gris). Les protéines dont l'expression est augmentée par Tax ou suite à l'infection par HTLV-1 sont indiquées en gras et en italique, et sont replacées dans les voies de signalisation auxquelles elles appartiennent. CADM-1 et Gem sont impliquées dans la formation des lamellipodes, la fascine dans la formation des filopodes et CRMP-2 dans la polarisation cellulaire.

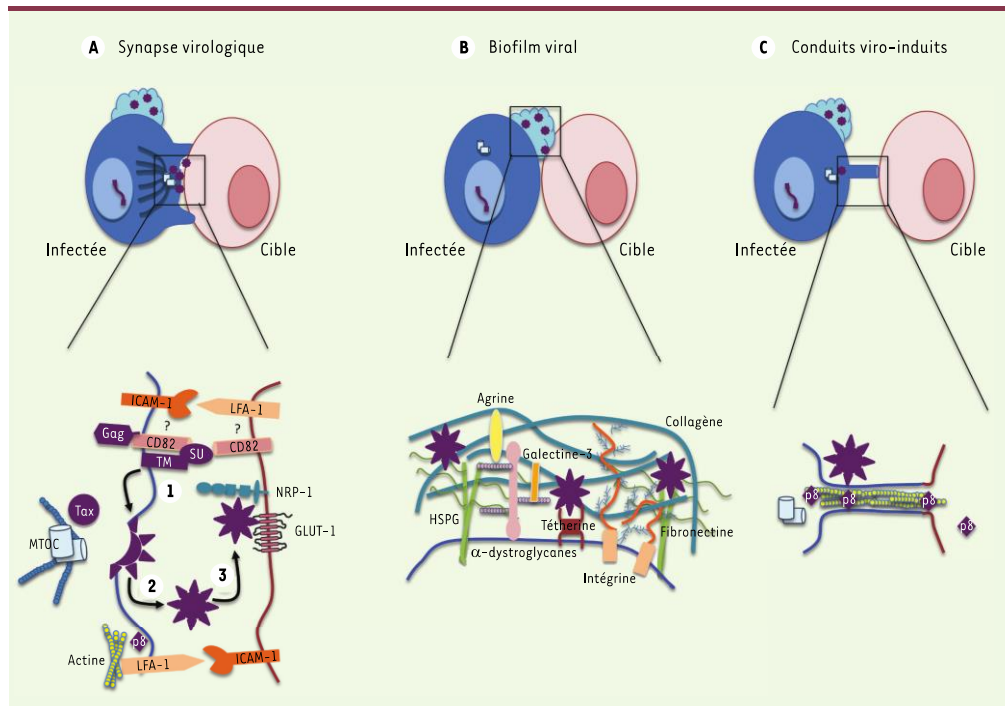
impliquées dans la régulation du cytosquelette (Figure 1). CRMP-2 (*collapsin response mediator protein 2*) participe à la polarisation et la migration des lymphocytes T [21]. La fascine<sup>3</sup> [22] stabilise les filaments d'actine en se concentrant au niveau des protrusions. Gem [23], une protéine de la famille des petites protéines G Rac/Rho, ou CADM-1 (*cell adhesion molecule 1*), une molécule d'adhérence impliquée dans l'infiltration des cellules tumorales [24], sont étroitement liées à la motilité et à l'adhérence des cellules infectées à leurs cellules cibles. L'engagement de CADM-1 permet le recrutement de TIAM (*T lymphoma invasion and metastasis*), un facteur d'échange pour la GTPase Rac, l'activation de Rac et la formation de lamellipodes [25]. Gem et la fascine colocalisent avec l'actine [22, 23], mais pas avec Tax, alors que CRMP-2 colocalise avec les microtubules et partiellement avec Tax au niveau des contacts cellule-cellule [26]. CRMP-2 permet l'assemblage des microtubules lorsqu'elle est phosphorylée par ROCK-II (*Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2*), une kinase activée par la GTPase Rho, ce qui pourrait contrôler la polarisation du MTOC. La fascine contrôle la stabilisation des filaments d'actine au niveau des filopodes par son interaction avec LIMK1/2 (*LIM domain kinase 1/2*), celle-ci est également contrôlée par la GTPase Rho.

<sup>3</sup> La fascine qui stabilise les filaments d'actine et se concentre au niveau des protrusions cellulaires (filopodes) lors de la migration. Elle est exprimée dans les cellules dendritiques, neuronales, mésenchymateuses et endothéliales, mais pas dans les lymphocytes. Elle est surexprimée dans de nombreux cancers (sein, côlon, poumon, etc.) et serait un marqueur pronostique et de métastase.

Dans les neurones, Gem est un régulateur négatif de ROCK1 (*Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1*), une kinase activée par la GTPase Rho qui est impliquée dans la rétraction des neurites. Gem pourrait donc aussi réguler ROCK1 et promouvoir la dépolymérisation de l'actine au niveau de la traîne cellulaire (uropode) dans les lymphocytes infectés par HTLV-1, permettant leur mouvement vers les cellules cibles. L'extinction de l'expression d'une seule de ces protéines suffit à diminuer fortement la migration des cellules infectées, suggérant que les trois mécanismes ne sont pas redondants. De plus, si les protéines Gem, CRMP-2 et fascine contrôlent à la fois la migration des cellules infectées et les contacts entre cellules, seule la protéine Gem est impliquée dans le transfert des particules virales vers la cellule cible [23].

### Une transmission polarisée au niveau du point de contact cellule-cellule

Le contact entre une cellule infectée et une cellule cible permet l'établissement d'une synapse virologique [27, 56], qui s'apparente partiellement à la synapse immunologique (Figure 2A, panneau du haut). Comme il le



**Figure 2.** Représentation schématique des trois voies de transmission du rétrovirus HTLV-1 d'un lymphocyte infecté vers un lymphocyte cible. Pour chaque panneau, la cellule infectée est représentée en bleu et la cible en rose, les virions ou les éléments viraux (ADN proviral ou protéines) sont représentés en violet. **A.** La synapse virologique est caractérisée par un contact étroit entre deux cellules, stabilisé par des interactions entre des protéines d'adhérence (ici ICAM-1 et LFA-1 exprimées à la fois sur les cellules infectées et les cellules cibles) et des interactions entre protéines virales et cellulaires (ici CD82 et SU ou SU et NRP-1). L'accumulation des protéines virales et du génome (non représenté) conduit (1) au bourgeonnement des virions dans la fente synaptique, puis (2) à la fixation des virions au niveau de la cellule cible sur les récepteurs également concentrés à la synapse (3). Afin de faciliter la lecture, l'échelle n'a pas été respectée. La polarisation du MTOC, représenté par deux centrioles et un réseau de microtubules (en bleu), est schématisée par sa localisation à proximité de la synapse. La protéine Tax est représentée à proximité du MTOC, mais sa localisation précise au niveau de la synapse n'est pas documentée. **B.** Biofilm viral : les virions sont localisés dans la matrice extracellulaire des lymphocytes infectés. La matrice extracellulaire est un réseau de glycoprotéines (agrine, collagène, galectine, HSPG) réticulé par des chaînes de carbohydrates (représentés par des traits fins verts [hépéparane sulfate] et bleu [mannose] ou des billes roses [galactose]). Les virions HTLV-1 sont représentés en violet, piégés dans la matrice par leur interaction avec la téthérine et les HSPG. L'échelle n'a pas été respectée pour plus de clarté. **C.** Conduit : protrusion membranaire émanant du lymphocyte T infecté vers le lymphocyte T cible. Ces extensions membranaires sont formées par la polymérisation de la F-actine (représentée par des ronds jaunes) et permettent une connexion directe avec le lymphocyte cible, facilitant le transfert de la protéine virale p8.

fait dans la synapse immunologique [57], le MTOC se polarise au point de contact lors de la formation de la synapse virologique [27]. À la différence de la synapse immunologique, cette polarisation a lieu dans la cellule infectée et non dans la cellule cible. Elle est associée à une accumulation des protéines Gag et Env à la jonction entre la cellule infectée et la cellule cible, ainsi qu'à celle du génome viral [27]. Ceci suggère que le virus pourrait bourgeonner au niveau du contact, une hypothèse démontrée par la détection de particules virales à l'intérieur de la fente synaptique [28, 29].

La synapse immunologique et la polarisation du MTOC sont les conséquences de l'engagement des récepteurs impliqués dans l'activation immunitaire comme le TcR, CD28, LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen*) et CD50 ou ICAM-3 (*intercellular cell-adhesion molecule 3*) [57]. Au contraire, dans les cellules infectées par HTLV-1, ces événements sont indépendants de l'activation du TcR, de la voie NF- $\kappa$ B [20, 30] ou de l'engagement de CD28, CD2 ou CD50 [31].





C'est en fait l'interaction entre les protéines d'adhérence ICAM-1 (CD54) présentes sur la cellule infectée, et LFA-1 exprimée par la cellule cible, qui permet l'établissement de la synapse virologique [27] et la polarisation du MTOC [20, 30, 31]. Or, ICAM-1 est surexprimée dans les cellules infectées. L'engagement d'ICAM-1 par des anticorps, ou par son ligand LFA-1, suffit à induire une voie de signalisation impliquant RAS/MEK/ERK qui conduit à la polarisation du MTOC vers le pôle de signalisation [30]. Le même processus est aussi induit par l'agrégation de LFA-1 ou de CD25 [31], dont l'expression augmente dans les cellules infectées. Ainsi, la synapse virologique est stabilisée par des complexes ICAM-1/LFA-1 et des complexes LFA-1/ICAM-1 (Figure 2A, panneau du bas).

La concentration de LFA-1 à la surface des cellules infectées est contrôlée par les protéines virales auxiliaires p12 et p8 [32, 33]. Ainsi, l'accumulation de LFA-1 induite par p12 augmente l'adhérence des lymphocytes T dans lesquels p12 est surexprimée [32]. Au contraire, p8 est recrutée à la membrane plasmique et colocalise avec LFA-1 [33] (Figure 2A, panneau du bas).

Enfin, une troisième protéine d'adhérence pourrait être engagée dans la formation de la synapse virologique. Il s'agit de CD82, une tétraspandine, qui colocalise avec LFA-1 pour stabiliser la synapse immunologique à la suite de l'engagement du TcR, et qui participe à la réorganisation du cytosquelette via une voie de signalisation impliquant les protéines Rho. La présence de CD82 n'a pas été recherchée au niveau de la synapse virologique, mais il est vraisemblable qu'elle y soit présente car elle interagit avec les protéines virales SU et TM [34], ainsi qu'avec Gag [35, 36] (Figure 2A, panneau du bas).

Ainsi, les protéines virales Gag, p8, p12, Env et Tax participeraient, selon des modalités distinctes, à l'induction de contacts cellulaires, la formation d'une synapse virale, l'assemblage des particules virales au point de contact et au transfert polarisé des virions.

### Le biofilm : agrégats infectieux à la surface de la cellule hôte, une alternative à la synapse virologique ?

En dehors du contact cellulaire établi lors de la synapse virologique, HTLV-1 peut aussi être transmis par l'intermédiaire d'un agrégat viral ou biofilm viral (Figure 2B, panneau du haut) [56]. Concentré à la surface des cellules productivement infectées, au niveau de la matrice extracellulaire, le biofilm viral est composé de collagène, de galectine-3 [58], d'agrines, d'intégrines et de glycosides complexes [37] (Figure 2B, panneau du bas). Il ne comporte ni fibronectine, ni galectine-1, ni  $\alpha$ -dystroglycane, ce qui suggère que l'accumulation de certaines protéines de la matrice extracellulaire y est sélective. On y trouve également la téthérine (également appelée BST-2 - *bone marrow stromal antigen 2* ou CD317) [37], une protéine dont la synthèse est induite par l'IFN (interféron) de type I, et dont la fonction, décrite dans les cellules infectées par VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine de type 1), est de restreindre la dissémination virale en retenant les virions au niveau de la membrane plasmique. L'expression de la téthérine dans les cellules infectées par HTLV-1 n'affecte cependant pas la transmission virale lorsque celle-ci a lieu par contacts cellu-

lares [38]. Au contraire, la présence de la protéine dans le biofilm pourrait contribuer au maintien du virus au niveau de la membrane plasmique, et favoriserait son transfert lors d'un contact avec une cellule cible. L'association du virus dans un biofilm confère aussi une protection physique aux particules virales qui sont particulièrement instables dans les milieux biologiques et peu glycosylées [39] (pour une revue complète sur les biofilms, voir [59]) (→).

Le biofilm présente une capacité d'adhérence rapide à d'autres cellules. À la différence de la synapse virologique, sa transmission ne nécessite ni la réorganisation du cytosquelette de la cellule infectée, ni sa polarisation. Ceci pourrait permettre un transfert rapide du virus, même lors d'un contact éphémère. *In vitro*, le décrochage mécanique du biofilm réduit le nombre de cellules infectées de plus de 80 % lors de la formation de conjugués cellule-cellule [37], démontrant que cette structure participe efficacement à la transmission virale.

### Les conduits : réseaux facilitant la transmission

En plus des agrégats viraux, on trouve au niveau des cellules infectées des protrusions nommées conduits (Figure 2C, panneau du haut). Ces structures sont formées *de novo* à partir de la membrane plasmique grâce à la polymérisation de l'actine-F qui forme des ponts entre les cellules productrices de virus et les cellules cibles. Ces conduits pourraient participer à la stabilisation des contacts entre les cellules, mais aussi permettre des échanges de protéines cytoplasmiques [33]. La protéine virale p8 augmente le nombre ou la longueur de ces conduits, mais aussi les contacts qu'ils établissent entre les cellules infectées et les cellules cibles [33]. Ces conduits permettent le transfert de la protéine p8 dans la cellule cible, avant ou concomitamment à l'infection (Figure 2C, panneau du bas). Le transfert de p8 permettrait de contrôler la réponse immune en diminuant la signalisation via le TcR et l'expression du CMH-1 (complexe majeur d'histocompatibilité) [33]. L'expression de p8 dans la cellule cible augmente l'expression de LFA-1 [33], dont l'interaction avec ICAM-1 au niveau de la cellule infectée est au cœur de la formation de conjugués et de l'établissement de la synapse virologique. Ainsi, la formation des conduits pourrait avoir une double fonction : stabiliser les interactions entre les cellules par des contacts autour de la synapse virologique, et permettre un passage d'éléments viraux (telle que la protéine p8) du cytoplasme de la cellule infectée vers celui de la cellule cible sans passage à la membrane.

(→) Voir la Synthèse de D. Lebeaux et J.M.Ghigo, m/s n° 8-9, août-septembre 2012, page 739





## Conclusions

HTLV-1 se transmet essentiellement lors de contacts cellule-cellule. La concentration virale au niveau de la synapse virologique ou du biofilm viral permet le transfert des virions de façon directionnelle et extrêmement efficace. Cette stratégie limite les interactions du virus avec le milieu, ce qui lui permet d'échapper à la réponse immunitaire [28, 40]. Dans une coculture de cellules infectées avec des cellules cibles, on peut observer à la fois des synapses virologiques, des conduits entre les cellules, un biofilm [33], ou bien un biofilm et des synapses virologiques [37]. Le mécanisme de transmission par contacts cellule-cellule n'est cependant pas unique à HTLV-1 [41]. En particulier, VIH-1 se transmet *via* une synapse virologique [40, 42], et le transfert de protéines virales au travers de conduits formés entre les cellules infectées et les cellules cibles participe à la transmission virale [43]. Comme pour HTLV-1, ce mode de transmission est bien plus efficace que la libération de particules virales libres [44]. En revanche, l'accumulation de VIH-1 dans un biofilm viral à la membrane plasmique des cellules infectées n'a pour l'instant pas été décrite. En dépit de la caractérisation des mécanismes de transmission de HTLV-1 décrits dans cette revue, plusieurs éléments restent mal compris. En particulier, on ne connaît pas encore les types cellulaires au sein desquels HTLV-1 se propage lors de la primo-infection, avant d'engager une réplication clonale dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. En effet, la majorité des travaux utilisent des lymphocytes T comme modèles, mais les mécanismes mis en jeu pour le transfert du virus d'une cellule à une autre pourraient être différents lorsque la cellule donneuse n'est pas un lymphocyte. De même, on ne connaît pas les mécanismes précis d'entrée du virus HTLV-1 dans la cellule cible lors de la transmission synaptique, ou lors du transfert de biofilm. Y a-t-il fusion à la membrane, ou, comme dans le cas du VIH-1, endocytose des particules virales et fusion dans les endosomes [45] ? Enfin, la nécessité d'un contact étroit entre une cellule infectée et sa cible suggère que le succès de l'infection pourrait aussi dépendre de signaux complémentaires induits par l'engagement de protéines cellulaires au moment du contact. Les études qui permettront de répondre à ces questions seront importantes pour une meilleure compréhension du mode de dissémination du virus lors de la primo-infection. ♦

## SUMMARY

### Intercellular transmission of HTLV-1: not all mechanisms have been revealed

HTLV-1 is the etiological agent of Adult T cell Leukemia/Lymphoma (ATLL) and of HTLV-1-Associated Myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). It is mainly detected in CD4<sup>+</sup> lymphocytes *in vivo*, but proviral genomes have also been detected although less frequently, in CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, B lymphocytes, monocytes, macrophages, dendritic cells and other non-lymphoid cells. Virus spread is highly dependent on cell-cell contact. This mode of transmission is correlated with an increased ability of infected cells to migrate, a property linked to cytoskeleton reorganization induced by the viral Tax protein. Cell-to-cell transmission relies on at least three non-exclusive molecular pathways. First, a specia-

lized area, the "virological synapse" (VS) promotes direct transmission of budding HTLV-1 particles into a synaptic cleft formed between infected and uninfected cells. Second, HTLV-1 particles accumulate at the plasma membrane of infected cells in a biofilm-like extracellular viral assembly that resembles a bacterial biofilm. Viral biofilm is rapidly transmitted to uninfected cells when infected cells contact target cells. Finally, membrane extensions called inter-cellular conduits facilitate HTLV-1 proteins transfer from infected to uninfected target cells, and may stabilize cell-cell contacts. The aim of this review is to summarize the molecular mechanisms of these HTLV-1 transmission pathways. ♦

## REMERCIEMENTS

Gerges Rizkallah est financé par l'université Saint Joseph du Liban et le CNRS-Liban. Hélène Dutartre est financée par l'Inserm. Renaud Mahieux est financé par l'École normale supérieure de Lyon et par un contrat hospitalier de recherche translationnelle (AP-HP hôpitaux de Paris). L'équipe oncogénèse rétrovirale remercie l'Inserm, l'ARC et la Ligue nationale contre le cancer (programme équipe labellisée) ainsi que le comité de la Ligue contre le cancer Rhône Alpes pour leur soutien financier. Les auteurs remercient le Dr Chloé Journo et le Dr Patrick Lécine pour leurs conseils lors de la rédaction du manuscrit.

## LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

1. Gessain A, Cassar O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Front Microbiol* 2012 ; 3 : 388.
2. Gessain A, Mahieux R. Tropical spastic paraparesis and HTLV-1 associated myelopathy: clinical, epidemiological, virological and therapeutic aspects. *Rev Neurol (Paris)* 2012 ; 168 : 257-69.
3. Plaque C, Jones KS. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Front Microbiol* 2012 ; 3 : 378.
4. Cook LB, Melamed A, Niederer H, et al. The role of HTLV-1 clonality, proviral structure, and genomic integration site in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 2014 ; 123 : 3925-31.
5. Journo C, Mahieux R. HTLV-1 and innate immunity. *Viruses* 2011 ; 3 : 1374-94.
6. Sze A, Belgnaoui SM, Olgagnier D, et al. Host restriction factor SAMHD1 limits human T cell leukemia virus type 1 infection of monocytes via STING-mediated apoptosis. *Cell Host Microbe* 2013 ; 14 : 422-34.
7. Nascimento CR, Lima MA, de Andrada Serpa MJ, et al. Monocytes from HTLV-1-infected patients are unable to fully mature into dendritic cells. *Blood* 2011 ; 117 : 489-99.
8. Jones KS, Cari PS, Huang YK, et al. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Med* 2008 ; 14 : 429-36.
9. Jones KS, Lambert S, Bouttier M, et al. Molecular aspects of HTLV-1 entry: functional domains of the HTLV-1 surface subunit (SU) and their relationships to the entry receptors. *Viruses* 2011 ; 3 : 794-810.
10. Takenouchi N, Jones KS, Lisinski I, et al. GLUT1 is not the primary binding receptor but is associated with cell-to-cell transmission of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol* 2007 ; 81 : 1506-10.
11. Manel N, Battini JL, Sitbon M. Human T cell leukemia virus envelope binding and virus entry are mediated by distinct domains of the glucose transporter GLUT1. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 29025-9.

## RÉFÉRENCES

12. Cheng W, Fu D, Wei ZF, et al. NRP-1 expression in bladder cancer and its implications for tumor progression. *Tumour Biol* 2014 ; 35 : 6089-94.
13. Parker MW, Xu P, Guo HF, Vander Kooy CM. Mechanism of selective VEGF-A binding by neuropilin-1 reveals a basis for specific ligand inhibition. *PLoS One* 2012 ; 7 : e49177.
14. Ellis LM. The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther* 2006 ; 5 : 1099-107.
15. Jain P, Manuel SL, Khan ZK, et al. DC-SIGN mediates cell-free infection and transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 by dendritic cells. *J Virol* 2009 ; 83 : 10908-21.
16. Jin Q, Agrawal L, Vanhorn-Ali Z, Alkhatib G. GLUT-1-independent infection of the glioblastoma/astrogloma U87 cells by the human T cell leukemia virus type 1. *Virology* 2006 ; 353 : 99-110.
17. Jin Q, Alkhatib B, Cornetta K, Alkhatib G. Alternate receptor usage of neuropilin-1 and glucose transporter protein 1 by the human T cell leukemia virus type 1. *Virology* 2010 ; 396 : 203-12.
18. Derse D, Heidecker G, Mitchell M, et al. Infectious transmission and replication of human T-cell leukemia virus type 1. *Front Biosci* 2004 ; 9 : 2495-9.
19. Mazurov D, Ilinskaya A, Heidecker G, et al. Quantitative comparison of HTLV-1 and HIV-1 cell-to-cell infection with new replication dependent vectors. *PLoS Pathog* 2010 ; 6 : e1000788.
20. Nejmeddine M, Barnard AL, Tanaka Y, et al. Human T-lymphotropic virus, type 1, Tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 29653-60.
21. Vincent P, Collette Y, Marignier R, et al. A role for the neuronal protein collapsin response mediator protein 2 in T lymphocyte polarization and migration. *J Immunol* 2005 ; 175 : 7650-60.
22. Kress AK, Kalmer M, Rowan AG, et al. The tumor marker Fascin is strongly induced by the Tax oncoprotein of HTLV-1 through NF-kappaB signals. *Blood* 2011 ; 117 : 3609-12.
23. Chevalier SA, Turpin J, Cachat A, et al. Gem-induced cytoskeleton remodeling increases cellular migration of HTLV-1-infected cells, formation of infected-to-target T-cell conjugates and viral transmission. *PLoS Pathog* 2014 ; 10 : e1003917.
24. Kobayashi S, Nakano K, Watanabe E, et al. CADM1 expression and stepwise downregulation of CD7 are closely associated with clonal expansion of HTLV-1-infected cells in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res* 2014 ; 20 : 2851-61.
25. Masuda M, Maruyama T, Ohta T, et al. CADM1 interacts with Tiam1 and promotes invasive phenotype of human T-cell leukemia virus type I-transformed cells and adult T-cell leukemia cells. *J Biol Chem* 2010 ; 285 : 15511-22.
26. Varrin-Doyer M, Nicolle A, Marignier R, et al. Human T lymphotropic virus type 1 increases T lymphocyte migration by recruiting the cytoskeleton organizer CRMP2. *J Immunol* 2012 ; 188 : 1222-33.
27. Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, et al. Spread of HTLV-1 between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* 2003 ; 299 : 1713-6.
28. Majorovits E, Nejmeddine M, Tanaka Y, et al. Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography. *PLoS One* 2008 ; 3 : e2251.
29. Pais-Correia AM, Sachse M, Guadagnini S, et al. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat Med* 2010 ; 16 : 83-9.
30. Nejmeddine M, Negi VS, Mukherjee S, et al. HTLV-1-Tax and ICAM-1 act on T-cell signal pathways to polarize the microtubule-organizing center at the virological synapse. *Blood* 2009 ; 114 : 1016-25.
31. Barnard AL, Igakura T, Tanaka Y, et al. Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes. *Blood* 2005 ; 106 : 988-98.
32. Kim SJ, Nair AM, Fernandez S, et al. Enhancement of LFA-1-mediated T cell adhesion by human T lymphotropic virus type 1 p1211. *J Immunol* 2006 ; 176 : 5463-70.
33. Van Prooyen N, Gold H, Andresen V, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 ; 107 : 20738-43.
34. Pique C, Lagaudrière-Gesbert C, Delamarre L, et al. Interaction of CD82 tetraspanin proteins with HTLV-1 envelope glycoproteins inhibits cell-to-cell fusion and virus transmission. *Virology* 2000 ; 276 : 455-65.
35. Mazurov D, Heidecker G, Derse D. HTLV-1 Gag protein associates with CD82 tetraspanin microdomains at the plasma membrane. *Virology* 2006 ; 346 : 194-204.
36. Mazurov D, Heidecker G, Derse D. The inner loop of tetraspanins CD82 and CD81 mediates interactions with human T cell lymphotropic virus type 1 Gag protein. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 3896-903.
37. Pais-Correia AM, Sachse M, Guadagnini S, et al. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat Med* 2010 ; 16 : 83-9.
38. Ilinskaya A, Derse D, Hill S, et al. Cell-cell transmission allows human T-lymphotropic virus 1 to circumvent tetherin restriction. *Virology* 2013 ; 436 : 201-9.
39. Shinagawa M, Jinno-Oue A, Shimizu N, et al. Human T-cell leukemia viruses are highly unstable over a wide range of temperatures. *J Gen Virol* 2012 ; 93 : 608-17.
40. Malbec M, Mouquet H, Schwartz O. Les anticorps anti-VIH-1 et la transmission virale de cellule à cellule. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 508-10.
41. Zhong P, Agosto LM, Munro JB, Mothes W. Cell-to-cell transmission of viruses. *Curr Opin Virol* 2013 ; 3 : 44-50.
42. Jolly C, Kashefi K, Hollinshead M, Sattentau QJ. HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *J Exp Med* 2004 ; 199 : 283-93.
43. Sherer NM, Lehmann MJ, Jimenez-Soto LF, et al. Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. *Nat Cell Biol* 2007 ; 9 : 310-5.
44. Zhong P, Agosto LM, Ilinskaya A, et al. Cell-to-cell transmission can overcome multiple donor and target cell barriers imposed on cell-free HIV. *PLoS One* 2013 ; 8 : e53138.
45. Dale BM, McNeerney GP, Thompson DL, et al. Cell-to-cell transfer of HIV-1 via virological synapses leads to endosomal virion maturation that activates viral membrane fusion. *Cell Host Microbe* 2011 ; 10 : 551-62.
46. Nagai M, Brennan MB, Sakai JA, et al. CD8(+) T cells are an *in vivo* reservoir for human T-cell lymphotropic virus type 1. *Blood* 2001 ; 98 : 1858-61.
47. Koyanagi Y, Itoyama Y, Nakamura N, et al. *In vivo* infection of human T-cell leukemia virus type 1 in non-T cells. *Virology* 1993 ; 196 : 25-33.
48. Ceccaldi P-É, Delebecque F, Prevost M-CC, et al. DC-SIGN facilitates fusion of dendritic cells with human T-cell leukemia virus type 1-infected cells. *J Virol* 2006 ; 80 : 4771-80.
49. Zunt JR, Dezzutti CS, Montano SM, et al. Cervical shedding of human T cell lymphotropic virus type 1 is associated with cervicitis. *J Infect Dis* 2002 ; 186 : 1669-72.
50. Belec L, Jean Georges A, Hallouin MC, et al. Human T-lymphotropic virus type 1 excretion and specific antibody response in paired saliva and cervicovaginal secretions. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996 ; 12 : 157-67.
51. Setoyama M, Mizoguchi S, Eizuru Y. Human T-cell lymphotropic virus type 1 infects eccrine sweat gland epithelia. *Int J Cancer* 1999 ; 80 : 652-5.
52. LeVasseur RJ, Southern SO, Southern PJ. Mammary epithelial cells support and transfer productive human T-cell lymphotropic virus infections. *J Hum Virol* 1998 ; 1 : 214-23.
53. Lehky TJ, Fox CH, Koenig S, et al. Detection of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) tax RNA in the central nervous system of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by *in situ* hybridization. *Ann Neurol* 1995 ; 37 : 167-75.
54. Lambert S, Bouthier M, Vassy R, et al. HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. *Blood* 2009 ; 113 : 5176-85.
55. Ghez D, Lepelletier Y, Lambert S, et al. Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *J Virol* 2006 ; 80 : 6844-54.
56. Bouchet J, Alcover A. La synapse immunologique. Une plate-forme de signalisation dynamique pour l'activation des lymphocytes T. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 665-70.
57. Thoulouze M, Alcover A. Le « biofilm viral » : un nouveau mode de dissémination des virus ? *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 571-3.
58. Adveissian T, Deshayes F, Porier F, et al. Les galectines, des lectines pas comme les autres. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 499-505.
59. Lebeaux D, Ghigo JM. Infections associées aux biofilms. Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ? *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 727-39.

REVUES



SYNTHÈSE

## TIRÉS À PART

H. Dutartre



Tarifs d'abonnement m/s - 2015

**Abonnez-vous**

à médecine/sciences

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

---

Bulletin d'abonnement

page 616 dans ce numéro de m/s



### 3 Les Cellules Dendritiques : définition, fonctions et sous-types

#### 3.1 Définition des cellules dendritiques (DCs)

C'est Ralph Steinman qui a identifié une population de "cellules stellaires" au niveau de préparations de splénocytes de souris. Au niveau morphologique, ces cellules se caractérisent par : un noyau large et réfractile contenant deux nucléoles, un cytoplasme abondant renfermant des mitochondries sphériques, plusieurs granules lipidiques dans les pseudopodes, une petite région périnucléaire qui renferme le corps de Golgi, une paire de centrioles ainsi que des corps multivésiculaires. Cependant, ces cellules sont mobiles : elles rétractent constamment leurs prolongements dendritiques cytoplasmiques ce qui module en continu leur morphologie. Leur mobilité les distingue d'ailleurs des macrophages qui sont relativement plus sédentaires. C'est en raison de la présence des dendrites que l'appellation "cellules dendritiques" (DCs) leur a été attribuée (Steinman and Cohn, 1973).

Les DCs font partie des phagocytes mononucléaires, groupe de cellules myéloïdes qui comprennent encore deux autres types cellulaires majeurs : les monocytes et les macrophages. Ces cellules modulent les fonctions immunitaires innées et adaptatives. Ces fonctions sont aussi partagées par d'autres cellules, en particulier les lymphocytes B avec qui les DCs forment le groupe des cellules présentatrices d'antigènes (CPAs).

A l'heure actuelle, différents sous-types de DCs sont décrits. La description d'un sous-type dépend de divers critères : sa localisation, son phénotype de surface, sa morphologie, son profil particulier d'expression des gènes, ses fonctions spécialisées. Les facteurs de transcription servant à la différenciation d'un sous-type de DCs complètent aussi sa description (Merad et al., 2013). Néanmoins, selon le micro-environnement spécifique dans lequel un sous-type de DCs se retrouve, son profil transcriptomique varie. Par exemple, en utilisant une analyse transcriptomique, Duluc a montré qu'au niveau vaginal, les DCs de Langerhans (LCs) sont davantage enrichies en transcrits qui participent à l'immunité (défensines, cytokines dont IL-1, IL-17...), au mécanisme de la phagocytose et à l'adhérence cellulaire (kératine) alors qu'au niveau de la peau, les cellules de Langerhans sont davantage enrichies en transcrits en relation avec les réactions métaboliques (Duluc et al., 2014). Ceci est illustré dans le pannel B de la figure 10.

Migratoires ou résidentes, les DCs sont localisées dans les organes lymphoïdes (thymus, foie, ganglions lymphatiques ou muqueuses associées aux ganglions lymphoïdes) ou non lymphoïdes

(organes stériles comme le pancréas, le cœur, le foie, les reins) ou ceux connectés à l'environnement comme la peau.

Bien qu'elles constituent environ 1% des cellules hématopoïétiques d'un organe lymphoïde ou du sang, les DCs sont des sentinelles du système immunitaire (O'Keeffe et al., 2015). Les DCs humaines (à l'exception des DCs de Langerhans (LCs)) se différencient à partir du précurseur hématopoïétique CD34+, qui est aussi le précurseur des monocytes (Lee et al., 2015).

## 3.2 Fonctions des DCs

Les DCs criblent leur environnement. En réponse à une variété de stimuli, elles mûrissent et migrent vers les organes lymphoïdes pour initier les réponses immunitaires. Dans ce qui suit je vais décrire les principales fonctions des DCs dont nous avons testé certaines au cours de mon étude sur l'interaction d'HTLV-1 et de différents sous-types de DCs.

### 3.2.1 Reconnaissance des pathogènes via les TLRs, maturation et migration des DCs

Les PAMPs ou les DAMPS (Pathogen or Damage Associated Molecular Pattern) qui sont des motifs moléculaires associés aux microorganismes se lient sur les PRRs (Pattern Recognition Receptor). Ces PRRs sont différemment exprimés par les sous-types de DCs (Legitimo et al., 2014). Parmi ces PRRs, les TLRs (Toll Like Receptor) sont des protéines transmembranaires comportant un domaine extracellulaire qui reçoit le signal de danger, un domaine transmembranaire et enfin un domaine intracellulaire contenant un *death domain* permettant la transduction du signal d'activation. L'activation des TLRs résulte en l'activation de trois voies pro-inflammatoires : la voie MAPK kinase (pour mitogen-activated protein kinase), la voie NF- $\kappa$ B et la voie de l'IRF. L'activation des TLRs active également TBK1 (pour TANK-binding kinase 1) et I $\kappa$ B kinase- $\epsilon$  (IKK $\epsilon$ ) qui sont responsables de la production de l'IFN (Barton and Kagan, 2009).

En réponse à l'engagement des TLRs, les DCs mûrissent. Lors de la maturation, les DCs rentrent dans un programme de différenciation à la suite duquel elles sur-expriment les molécules de co-stimulation (CD80, CD86) qui fournissent aux lymphocytes T un signal nécessaire à son activation. Elles sur-expriment aussi les molécules du CMH-I et II (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). L'équipe de Moris a récemment exploré les conséquences de l'engagement des TLR 1, 2,

3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sur l'expression des marqueurs classiques d'activation des MDDCs : CD86, CD83, CMH-I et HLA-DR (CMH-II). L'équipe a montré qu'en 24 heures de stimulation, tous les agonistes des TLRs, à l'exception du TLR2, induisent une sur-régulation importante de CD86, CD83, CMH-I et HLA-DR. Les sur-expressions les plus importantes de CD86, CD83 et HLA-DR sont particulièrement observées à la suite de l'engagement du TLR-4 par son agoniste, le LPS. Au contraire, les autres agonistes des TLRs induisent un moindre changement de l'expression de ces marqueurs (Cardinaud et al., 2017) .

La maturation coïncide aussi avec la migration des DCs vers les ganglions lymphatiques où les DCs induisent l'expansion clonale des lymphocytes T spécifiques d'un antigène donné.

La migration est un procédé cellulaire complexe qui requiert l'intégration de divers événements : la formation du contact cellule-cellule ou cellule-matrice et l'acquisition d'un phénotype mobile. Ce sont les GTPases, Cdc42, Rac et Rho qui manipulent la réorganisation du cytosquelette d'actine des DCs (Burns et al., 2001). La protéine Wasp pour "Wiskott-Aldrich Syndrome Protein", exprimée par les cellules hématopoïétiques transduit les signaux de la surface cellulaire au cytosquelette d'actine. Ceci se fait à travers la liaison spécifique de WASp à Cdc42, et à Rac (Aspenström et al., 1996). Le domaine C-terminal de WASp lie aussi le complexe Arp2/3 (pour actin related protein 2/3) dont la fonction est d'organiser le cytosquelette des eucaryotes à travers la nucléation du filament d'actine puis la liaison de ce néo-filament par son extrémité à un autre filament. De plus, la stabilité que confère WASp au cytosquelette d'actine des DCs contribue étroitement au contact DC-lymphocyte T (Malinova et al., 2016). D'après Malinova, en l'absence de WASp au niveau des DCs, le réseau d'actine localisé au niveau du contact DC-lymphocyte T (synapse immunologique) est moins stable. De même, l'absence de WASp des DCs, conduit à la diminution de la polarisation d'ICAM-1 et des molécules du CMH-II au niveau de la synapse immunologique (Malinova et al., 2016) ce qui suggère que l'induction du lymphocyte par la DC est réduite.

L'expression de certains récepteurs est impliquée dans la migration des DCs. Par exemple, l'activation du récepteur CCR7 des chimiokines de la famille CC permet la migration des LCs murines de l'épiderme vers le derme (Ohl et al., 2004). De même, les inhibiteurs de l'acétylation des histones (HDACis) jouent un rôle immunomodulateur à travers la suppression de la migration des DCs murines immatures. Ceci se fait ici à travers la régulation de l'expression de CCR1 à la surface des DCs (Kim and Lee, 2017). De même, la maturation des DCs murines *in vitro* ou *in*

*in vivo* est accompagnée de la sur-expression des récepteurs S1P1 et S1P3 des sphingosines-1-phosphate (S1P). La S1P, métabolite de différents types cellulaires comme les plaquettes est un médiateur lipidique doué de propriétés chémo-attractives à l'égard de différents types cellulaires comme les lymphocytes B et les DCs. L'équipe de Czeloth a ici démontré que seules les DCs matures sont capables de migrer sous l'effet de S1P et que le traitement des DCs matures avec les inhibiteurs spécifiques des GTPases Rac, Cdc42 ou Rho abolit leur migration (Czeloth et al., 2005). Dans ce cas, la stimulation des DCs matures par S1P active en premier lieu la protéine G hétérotrimérique  $G_{\alpha i}$  (Sugimoto et al., 2003). Ensuite, les signaux relatifs à la migration sont transmis à Cdc42 et aux GTPases Rac ou AKT, des protéines qui régulent les voies de signalisation relatives à différentes fonctions cellulaires comme la migration, la macropinocytose et la progression du cycle cellulaire (Arikawa et al., 2003). C'est le PI3K (pour phosphatidyl-inositol-3-kinase) qui active AKT1 ou Rac1 (Singh, 2016). D'ailleurs, des DCs matures de souris qui sont déficientes en Rac (Rac1 et Rac2), deux GTPases de la famille Rho associées à la membrane plasmique, ne sont ni mobiles ni capables de migrer vers les ganglions lymphatiques (Benvenuti et al., 2004). Notons enfin que Rac2 détermine l'assemblage subcellulaire de la NADPH oxydase (NOX2) aux phagosomes. L'activité de NOX2 sera particulièrement revue dans le chapitre 4.4.1 au moment de la description des mécanismes d'actions des agents lysosomotropes lors d'une infection cellulaire productive (ou cis-infection).

### 3.2.2 La présentation antigénique et la sécrétion des cytokines par les DCs

La présentation d'un antigène par une DC aux lymphocytes T constitue la fonction principale de la DC (Albert et al., 1998). Les récepteurs des cellules T (TCR) reconnaissent spécifiquement les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) en association avec des peptides de taille variable. Ces peptides sont générés à partir des antigènes internalisés dans la DC puis chargés sur les molécules du CMH avant d'être transportés à la surface cellulaire. Les DCs sont 300 fois plus puissantes que les PBMCs dans la stimulation des lymphocytes adultes (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Nous parlons de présentation croisée (en anglais, cross-presentation) lorsque l'APC présente l'antigène via sa molécule du CMH-I aux lymphocytes T CD8+.

Dans la présentation croisée, "les compartiments de présentation antigénique" correspondent aux compartiments où les protéases apprêtent les antigènes qui sont capturés et destinés à être présentés. Ces compartiments sont identifiés par plusieurs marqueurs : Rab5 et EEA1 (Burgdorf

et al., 2007), Rab14 et RAB3b/3c (Zou et al., 2009). La caractéristique de ces compartiments est qu'il sont capables de garder les antigènes ou les pathogènes sur des périodes prolongées de 2 à 3 jours sans protéolyse (Faure et al., 2009) et ceci grâce au recrutement du complexe de la NADPH oxydase (Savina et al., 2006). Le complexe de la NADPH oxydase empêche le pH du compartiment de s'acidifier rapidement. C'est le trafic des antigènes vers les endosomes tardifs ou les lysosomes qui assure la présentation antigénique efficace aux lymphocytes T CD4+ (Mahnke et al., 2000). L'autophagie, mécanisme regroupant plusieurs voies de dégradation lysosomale des constituants cellulaires, augmente l'efficacité de la présentation antigénique dans les DCs à travers la fusion continue des autophagosomes avec les compartiments de présentation (Schmid et al., 2007).

Les DCs qui présentent un antigène délivrent trois sortes de signaux aux lymphocytes T naïfs. Le premier signal provient du peptide antigénique lié au complexe majeur d'histocompatibilité. Le second signal correspond à la signalisation à travers la molécule de co-stimulation CD28 du lymphocyte T qui lie le CD80 ou le CD86 (Schoenberger et al., 1998) de la surface des DCs. Le troisième signal correspond aux cytokines qui sont impliquées dans la polarisation de la réponse effectrice des lymphocytes T. Les différents signaux de co-stimulation favorisent la différenciation des lymphocytes T (Heath and Carbone, 2001).

Les signaux transmis aux lymphocytes T ne sont pas toujours des signaux inducteurs. Par exemple, CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 ou CD152) est un membre de la superfamille des immunoglobulines qui transmet un signal inhibiteur aux lymphocytes T. Lors de l'interaction entre lymphocytes Treg et les DCs, l'induction de CD80 par CTLA-4-Ig conduit à la sécrétion de l'IFN- $\gamma$  par les DCs (Logue and Sha, 2004). L'IFN- $\gamma$  a un effet autocrine sur les DCs. Cet effet conduit à la sécrétion de l'enzyme IDO (tryptophan-catabolizing indoleamine 2,3-dioxygénase) par la DC. A l'état physiologique, l'IDO produite par les DCs catalyse le tryptophane en divers métabolites. La déplétion du tryptophane de son milieu est associée à l'inhibition des fonctions ainsi que de la prolifération des lymphocytes T (Mellor and Munn, 2004), du fait de l'arrêt du cycle cellulaire (Munn et al., 1999). De même, l'exposition *in vitro*, des DCs ou des pDCs au VIH-1 induit une activité IDO conduisant à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4+ et en la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Treg CD4+CD25+FOXP3 (Manches et al., 2008). L'augmentation de l'activité IDO a été également

observée *in vivo*, chez des patients infectés par le VIH-1 (Boasso et al., 2007), chez les patients infectés par le virus de l'hépatite C (VHC) (Larrea et al., 2007) et le virus de l'hépatite B (VHB) (Chen et al., 2009), ce qui suggère que l'induction de l'activité IDO pourrait être un des mécanismes de persistance virale. Notons toutefois que l'expression de l'IDO peut être réprimée à la suite du traitement des DCs par l'IL-6 recombinante ou à la suite de l'engagement de CD80 ou de CD86 par CD28. Ici, la stimulation par l'IL-6 conduit à la sous-régulation de l'expression du récepteur de l'IFN- $\gamma$ . Ceci est corrélé avec la réduction de l'habilité de ces cellules à métaboliser le tryptophane et à initier l'apoptose des lymphocytes T *in vitro* (Grohmann et al., 2001).

En dehors de l'induction de l'IDO qui permettrait l'échappement viral à la réponse immune, les pathogènes inhibent aussi la présentation antigénique afin de contourner les défenses de l'hôte. J'aborderai, au chapitre 4 cet aspect en partant de l'exemple de nombreux virus.

Enfin, la polarisation de la réponse effectrice des lymphocytes T dépend des cytokines produites par les DCs mais aussi des cytokines présentes dans le micro-environnement des lymphocytes T (Song et al., 2017). D'ailleurs, les cytokines présentes dans le microenvironnement des DCs modulent à la fois la sécrétion des cytokines par les DCs et l'orientation de la réponse immune des lymphocytes T. Par exemple, les DCs humaines exposées à l'IL-10 ne secrètent plus les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 et TNF- $\alpha$  après stimulation au LPS. Dans ce cas, aucune induction de la prolifération des lymphocytes T ne peut avoir lieu (Yang and Lattime, 2003).

L'orientation de la réponse immune adaptative des lymphocytes inclut la polarisation Th1, Th2, Th17 et Treg. Le développement des deux réponses Th1 et Th2 est mutuellement antagoniste. L'IFN  $\gamma$  (signature des Th1) bloque le développement des Th2 via l'inhibition de la production d'IL-4 (signature des Th2) et réciproquement (Steinman and Hemmi, 2006). De même, l'IL-35, cytokine produite par les lymphocytes Treg supprime l'orientation Th17.

Les caractéristiques de ces 4 polarisations sont décrites dans le tableau 3 ci-dessous :



<u>Type d'orientation immune</u>	<u>Principales cytokines inductrice de l'orientation immune</u>	<u>Caractéristique de l'orientation immune</u>
Th1 ou immunité cellulaire	IL-12, IL-18, IL-27	Les lymphocytes Th1 sécrètent majoritairement de l'IFN $\gamma$ et de l'IL2 induisant des réponses immunes essentiellement à médiation cellulaire.
Th2 ou immunité humorale	IL-33	La réponse Th2 assure l'activation des lymphocytes B et leur différenciation en plasmocytes. Ceci favorise l'élimination de pathogènes comme les helminthes. Les lymphocytes Th2 produisent l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-25.
Th17	TGF- $\beta$ , IL-6, IL-22, IL-23	Les lymphocytes Th17 interviennent dans le contrôle des infections bactériennes et fongique. Ils sécrètent l'IL-17, l'IL-26.
T régulateurs	TGF- $\beta$ , IL-10, IL-35	Les lymphocytes Treg inhibent les réponses immunitaires des lymphocytes T et sécrètent des cytokines anti-inflammatoires (IL-28, IL-29).

Tableau 3 : Ce tableau résume 4 types d'orientations immunes des lymphocytes T. Il précise les principales cytokines présentes dans l'environnement des lymphocytes T lors de l'orientation immune ainsi que le ou les traits principal/aux de l'orientation immune. Ce tableau est inspiré du manuel "Immunology : an illustrated outline" de David Male. (Edition Garland Science, 5<sup>ème</sup> édition).

### 3.2.3 La production de l'interféron par les DCs

Les IFNs de type I (IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ ) sont des cytokines produites par les cellules du système immunitaire mais également par les cellules épithéliales et les fibroblastes à de faibles concentrations dans les conditions physiologiques normales. Cependant leur production est augmentée à la suite de l'exposition de ces cellules à des pathogènes ou aux produits des pathogènes comme l'ARN viral (Belardelli, 1995). Ce sont les DCs plasmacytoïdes (pDCs) qui produisent majoritairement l'IFN- $\alpha$  *in vivo* (Siegal et al., 1999). Il existe 12 sous-types différents pour l'IFN- $\alpha$  contre un seul sous-type pour l'IFN- $\beta$  (Lavender et al., 2016). Cependant, c'est l'IFN  $\alpha$  de type 2 qui est le sous-type utilisé en clinique (Harper et al., 2015). L'IFN est utilisé en

combinaison avec la zidovudine dans le traitement de l'ATL de type chronique, aiguë et indolente (Nasr et al., 2017).

La liaison des IFNs à leur récepteur aboutit à la régulation de l'expression de plus de 300 ISGs. Ces gènes codent pour des protéines aux activités anti-virales et immunorégulatrices qui, dans certains cas peuvent supprimer la réplication du virus et permettre la clairance virale. Parmi les ISGs, MxA, OAS et A3G (APOBEC-3G) qui sont considérés comme d'excellents marqueurs de l'action de l'IFN et exercent particulièrement un rôle de premier plan dans les réponses immunes intra-cellulaires comme nous pouvons le constater à travers le tableau 4 ci-dessous (pour revue (Sadler and Williams, 2008)).

<u>ISG</u>	<u>Etape ciblée au niveau du cycle viral</u>
MxA	Cette protéine s'accumule sous forme de monomères dans le cytoplasme et les membranes intracellulaires du réticulum endoplasmique. Au moment de l'infection virale, les monomères de MxA lient les nucléocapsides des virus ainsi que d'autres composants viraux en vue de les dégrader. Les familles de virus touchées par l'activité de MxA comprennent : <i>Orthomyxoviridae</i> , <i>Bunyaviridae</i> , <i>Rhabdoviridae</i> , <i>Paramyxoviridae</i> , <i>Picornaviridae</i> , <i>Togaviridae</i> , <i>Reoviridae</i> , <i>Hepadnaviridae</i> , <i>Asfarviridae</i> et <i>Poxviridae</i> (Pavlovic et al., 1990). Nous pouvons retrouver une liste exhaustive des virus dont l'infection est restreinte par l'activité de MxA dans la revue d'Haller (Haller et al., 2015).
TRIM 5 $\alpha$ (simian tripartite interaction motif)	TRIM 5 $\alpha$ empêche la décapsidation du VIH-1 ce qui abolit les étapes de transcription inverse ainsi l'intégration du VIH-1 dans le génome de la cellule hôte (Richardson et al., 2014). Par exemple, les travaux de Ribeiro montrent que la liaison du VIH-1 à la langérine, récepteur des LCs induit la restriction par TRIM5 $\alpha$ . Ici, TRIM5 $\alpha$ interfère avec la voie de l'autophagie pour dégrader le VIH-1 et prévenir l'infection des LCs (Ribeiro et al., 2016). TRIM5 $\alpha$ restreint la réplication d'HTLV-1 : les polymorphismes liés à TRIM5 $\alpha$ sont associés à des charges provirales élevées (Nozuma et al., 2017).
APOBEC3G (apolipoprotéin B mRNA-editing catalytic polypeptide-like 3G)	APOBEC3G est un facteur de restriction de l'infection par le VIH-1 et le VHB. APOBEC3G édite le génome du VIH-1 et du VHB durant la transcription inverse à travers la désamination d'une cytidine. L'activité d'APOBEC3G génère des hypermutations au niveau des génomes du VIH-1 et du VHB

	<p>qui ne sont plus viables (Adolph et al., 2013), (Letko et al., 2015) et (Chen et al., 2017a).</p> <p>APOBEC3G est incorporée dans les virions d'HTLV-1. Néanmoins, l'inhibition par APOBEC3G de l'infection par HTLV-1 se fait, <i>in vitro</i>, selon un mécanisme différent de la désamination de la cytidine (Sasada et al., 2005). En revanche, APOBEC3G n'est pas efficace pour restreindre l'infection par HTLV-1, <i>in vivo</i> (Mahieux et al., 2005).</p>
RNAse L	<p>Elle dégrade l'ARNm du virus de la dengue (Lin et al., 2009), du virus chikungunya et du VHC (Sadler and Williams, 2008). De plus, les polymorphismes de la RNAseL n'affectent pas son activité répressive contre le VHB, VHC, VIH-1 et HTLV-1 (Arredondo et al., 2012).</p>
PKR (double-stranded RNA (ds-RNA)-activated serine/threonine protein kinase	<p>PKR est une kinase exprimée dans tous les tissus. Elle affecte la phosphorylation du facteur 2 d'initiation chez les eucaryotes (Eif2) ce qui supprime la traduction de l'ARNm (Sadler and Williams, 2008).</p> <p>L'infection par le VIH-1 est suivie par l'induction de PKR. PKR interfère avec le VIH-1 via la phosphorylation de Tat. Ici la phosphorylation de Tat se fait au niveau de 5 résidus spécifiques Ser/Thr. La phosphorylation de Tat par PKR résulte en l'inhibition significative de l'activité de Tat et en la restriction de la réplication du VIH-1 (Yoon et al., 2015).</p> <p>PKR inhibe l'infection par HTLV-1 des lymphocytes traités à l'IFN (Cachat et al., 2013).</p>
Tétherine	<p>La tétherine également appelée BST-2 ou CD317 est une protéine trans-membranaire ancrée dans la membrane plasmique au niveau des rafts lipidiques. Les études de Bego montrent que le gène de la tetherine est activé de manière précoce en post-stimulation par l'IFN. Aussi, l'expression de la tetherine est maintenue même en l'absence de l'IFN-<math>\alpha</math> (Bego et al., 2012). Le rôle de la tétherine est d'empêcher le relargage des virions et ceci à travers leur rétention au niveau de la membrane plasmique des cellules infectées. Elle prévient la libération des particules de VIH-1 à partir des cellules infectées (Harris et al., 2012). Ainsi, la tetherine fait partie de l'immunité cellulaire innée (Liberatore et al., 2017).</p>

Tableau 4 : Fonctions anti-virales de 6 ISGs (pour revue (Sadler and Williams, 2008)).

L'IFN de type 1 augmente la survie des pDCs (Kadowaki et al., 2001). Il stimule également l'expression des molécules du CMH-I par les DCs (Schwartz et al., 1996). L'IFN de type 1 peut

aussi favoriser la différenciation des monocytes en DCs durant les infections virales (Lapenta et al., 2003). Le Bon a montré que l'IFN- $\alpha$  renforce la présentation croisée impliquant des lymphocytes T CD8+ dans un modèle murin (Le Bon et al., 2003). Dans un modèle humain, les DCs inflammatoires IFN- $\alpha$  DCs différenciées *in vitro* en présence d'IFN sont supérieures aux IL-4 DCs autologues en terme d'efficacité de présentation croisée aux lymphocytes T CD8+ (Lapenta et al., 2006).

Enfin, lors de l'infection par le VIH-1, l'IFN- $\alpha$  inhibe à la fois la réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4+, les DCs et les macrophages *in vitro* ainsi que la transmission cellule-cellule du VIH-1 entre les lymphocytes T CD4+ et entre DCs-lymphocytes T (Coleman et al., 2011).

### 3.3 Sous-types de DCs *in vivo* et *in vitro*

Le précurseur hématopoïétique CD34+ permet à la fois la différenciation des pDCs et du progéniteur des DCs classiques, le pré-cDC. Le pré-cDC se différencie exclusivement en DCs CD1c+ et en DCs CD141+. *In vivo*, les autres types des DCs se différencient séparément à partir des monocytes (O'Keeffe et al., 2015). Le derme et l'épiderme renferment un sous-type de DCs, les cellules de Langerhans (LCs). Les études récentes suggèrent que la différenciation des LCs est indépendante du précurseur de la moelle osseuse. Les LCs ne se différencient également pas à partir des monocytes dans la mesure où l'épiderme n'est pas irrigué. Les LCs de l'épiderme constitueraient donc un sous-type qui est apparentée aux macrophages non lymphoïdes des tissus. Cependant, au contraire des macrophages, les LCs peuvent migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques (Malissen et al., 2014).

Dans ce qui suit, je vais décrire les sous-types de DCs retrouvés *in vivo* : les cDCs (DCs classiques), les pDCs (DCs plasmacytoïdes), les DCs inflammatoires et les cellules de Langerhans. Ensuite, je vais décrire les cellules dendritiques dérivées de monocytes (MDDCs) différenciées *in vitro* que nous avons utilisées d'ailleurs dans mon étude afin de mimer des sous-types de DCs *in vivo*. La comparaison des caractéristiques des MDDCs *in vitro* aux sous-types correspondant de DCs *in vivo* constituera un point que j'aborderai lors de la discussion de la justesse du modèle expérimental utilisé.

### 3.3.1 Cellules dendritiques classiques (cDCs)

Ces cellules capturent les antigènes dans les tissus périphériques. Elles appréhendent, présentent ces antigènes et migrent via les vaisseaux lymphatiques afférents vers les organes lymphoïdes secondaires. A leurs niveaux, et au contact des lymphocytes T, elles initient les réponses immunitaires adaptatives. Les DCs classiques ont une demi-vie de quelques jours (entre 3 à 5 jours) (Satpathy et al., 2012) et sont continuellement remplacées à partir des précurseurs de la moelle osseuse. Cette régénération dépend de la cytokine Flt3L (Proietto et al., 2012).

Les DCs classiques existent en deux états fonctionnels :

- Les DCs immatures : nouvellement différenciées, elles possèdent une forte activité d'endocytose. Elles expriment faiblement les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II.
- Les DCs matures : aussitôt que les DCs immatures reconnaissent les PAMPs ou les DAMPS ou qu'elles sont sujettes à des stimuli inflammatoires, elles sur-régulent l'expression cytoplasmique des molécules du CMH-I et II et l'expression des molécules de co-stimulation (CD80, CD86).

Les DCs classiques se partagent en deux sous-types de DCs : les DCs CD141+ et les DCs CD1c+.

#### 3.3.1.1 Le sous-type des DCs CD141+

Ces DCs sont retrouvés dans le sang, les ganglions lymphatiques, la rate, les amygdales, le foie, le poumon, la peau et les intestins. Elles représentent moins de 0.03% des PBMCs au niveau des tissus périphériques de l'homme. Ces DCs expriment des taux élevés de TLR qui reconnaissent le double brin de l'ARN et le simple brin de l'ARN (TLR8).

Les DCs CD141+ ne produisent pas des taux élevés d'IL-12 (Hémont et al., 2013a). Cependant, ces DCs produisent de l'IFN de type 3 (Egli et al., 2014). Cet IFN de type 3 est plus efficace que l'IFN de type 1 dans la protection contre le rotavirus ou le norovirus, des virus au tropisme cellulaire épithélial élevé (Nice et al., 2015). Les DCs CD141+ produisent cet IFN en réponse à l'HCV ou à l'agoniste du TLR 3, le PolyI :C (Yoshio et al., 2013a) et (Lauterbach et al., 2010).

C'est l'expression exclusive de XCR par les DCs CD141+ qui permet la génération optimale des réponses immunitaire à médiation cellulaire cytotoxique anti-tumorale et anti-virale (Bachem et al., 2010). D'ailleurs, le ligand de XCR1, XCL1 est sécrété par les lymphocytes T CD8+ activés

et agit comme un puissant chémoattractant (Dorner et al., 2009). C'est encore l'expression de la lectine de type C CLEC9A, un récepteur des cellules mortes, qui rend ces DCs efficaces dans la présentation croisée des antigènes de cellules tumorales mortes (Zhang et al., 2012). Les DCs CD141+ sont capables de stimuler la prolifération *in vitro* des lymphocytes T CD4+ allogéniques (Yu et al., 2014). Après engagement du TLR3, les DCs CD141+ peuvent polariser les lymphocytes T CD4+ vers un phénotype Th1 (Hémont et al., 2013a). Les DCs CD141+ sont aussi capables d'induire des réponses immunitaires de type Th2 après stimulation par le virus vivant atténué de l'influenza de type A (Yu et al., 2014). Les DCs CD141+ qui se retrouvent au niveau de la peau enflammée exercent des fonctions tolérogènes via la production de l'IL-10 et l'induction des Treg (Chu et al., 2012).

### 3.3.1.2 Le sous-type des DCs CD1c+

Les DCs CD1c+ sont retrouvées dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes : au niveau du sang, des ganglions lymphatiques, des amygdales, de la peau, du foie, des reins, du poumon et du tube digestif. Les DCs CD1c+ sont influencées par leur environnement local et exercent donc des fonctions spécialisées selon les organes où elles se trouvent (Watchmaker et al., 2014).

Le TGF- $\beta$  induit l'expression de la langérine sur les DCs CD1c+. Aussi, toutes les DCs exprimant la langérine sont CD1c+ (Bigley et al., 2015). Les DCs CD1c+ induisent des réponses Th1, Th2 et Th17. Les DCs CD1c+ ont, similairement aux DCs CD141+, la capacité de stimuler les lymphocytes T CD8+ (Cohn et al., 2013) et (Yu et al., 2014). Les sous-types de DCs CD1c+ et DC CD141+ induisent similairement la production des cytokines Th2 (l'IL-4 et de l'IL-13) par les lymphocytes T CD4+ allogéniques (Hémont et al., 2013b) et (Yu et al., 2014). Les DCs CD1c+ intestinales expriment CLEC4A (Watchmaker et al., 2014) qui prévient l'auto-immunité (Fujikado et al., 2008). Dans ce même contexte, Watchmaker constate aussi que les DCs CD1c+ induisent les lymphocytes Treg au niveau de l'intestin.

Les DCs CD1c+ expriment d'autres protéines impliquées dans les régulations immunes comme IRAK3, un régulateur négatif de la signalisation via les TLRs ainsi que VSIG4, un régulateur négatif de l'activation des lymphocytes T. De même, ces DCs expriment des gènes impliqués dans la régulation de la signalisation de l'IL-22 (Watchmaker et al., 2014). Enfin, au cours des bronchopneumopathies obstructives chroniques, c'est l'expression élevée de certaines molécules

régulatrices (ILT4, ICOS-L et PD-L1), ainsi que la production importante de l'IL-10 par ces DCs qui permettent la suppression immunitaire (Sato et al., 2013). Comme ces DCs CD1c+ se retrouvent au niveau du tube digestif, elles constituent probablement les premières cellules qui reconnaissent HTLV-1 à la suite de sa transmission verticale par allaitement. C'est pour cela que nous nous sommes demandés si les propriétés tolérogènes de ce sous-type de DCs affectent son interaction avec HTLV-1.

### 3.3.2 Cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les DCs plasmacytoïdes ou pDCs sont retrouvés au niveau du sang et des organes lymphoïdes. Elles sont rares dans les tissus non lymphoïdes (Reizis et al., 2011). Contrairement à la morphologie stellaire des cDCs, les pDCs ont un aspect sphérique et se distinguent par leur expression spécifique de BDCA2 (CD303) en surface. Après le contact avec un virus ou des bactéries, les DCs plasmacytoïdes sécrètent de l'IFN de type I et des cytokines inflammatoires (Reizis et al., 2011) et (Michea et al., 2013). Le sous-type de pDCs sur-exprimant la protéine CD2 produit l'IL-12 en réponse à l'infection par le virus de l'influenza de type A (Matsui et al., 2009). Les pDCs produisent aussi de l'IFN de type III qui assure les réponses anti-virales dans les muqueuses (Yoshio et al., 2013). Les pDCs expriment le granzyme B. Le sous-type CD2+ exprime le lysozyme. Ces deux protéines renforcent l'activité lytique des pDCs (Matsui et al., 2009).

Dans ce contexte, Macal a montré que le clone 13 du virus LCMV (pour Old World arenaviruses lymphocytic choriomeningitis) infecte les pDCs. Néanmoins, Macal a également montré que la réplication de ce virus dans les pDCs n'est pas un prérequis pour la production de l'IFN : des pDCs non infectées par LCMV produisent de l'IFN de type I et de l'IL-12. Au niveau de ces pDCs non infectées, la production de l'IFN fait suite à l'engagement du TLR7/MyD88/IRF7 des pDCs par un simple brin d'ARN viral (Macal et al., 2012). La production de l'IFN via l'engagement du TLR7 permet de contrôler, ici, l'infection virale chronique. A l'heure actuelle, des agonistes du TLR7 sont testés pour le traitement des infections virales chroniques : par exemple, la molécule GS-9620, un agoniste du TLR7 qui supprime l'infection chronique par le VHB au niveau de modèles animaux est en cours d'essais cliniques sur des patients infectés chroniquement par le VHB (Bam et al., 2017). Enfin, malgré leur rôle pro-inflammatoire, les pDCs sont associées aux

mécanismes de tolérance. Ils sont, en effet, capables d'induire les lymphocytes Treg comme par exemple à la suite d'une greffe afin de limiter les réactions de rejet (Hadeiba et al., 2008).

### 3.3.3 Cellules dendritiques inflammatoires

Le GM-CSF et l'IFN- $\alpha$  permettent la différenciation, *in vivo*, des IFN- $\alpha$  DCs à partir des monocytes ou des progéniteurs CD34+. Selon le modèle décrit par Farkas, les monocytes de la peau sont capables de migrer. *In vivo*, au cours de l'inflammation chronique, le GM-CSF produit par une variété de cellules cutanées (les lymphocytes T activés, les mastocytes, les fibroblastes, les macrophages, les neutrophiles et les kératinocytes, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales) et l'IFN- $\alpha$  produit par les pDCs participent à la différenciation des DCs inflammatoires (Farkas et al., 2008). Les DCs inflammatoires participent aux désordres auto-immuns comme le lupus érythémateux disséminé, le psoriasis et la dermatite atopique (Johnson-Huang et al., 2009). Enfin, cette induction de la différenciation des DCs *in vitro* par le GM-CSF suggère que les monocytes constituent un important réservoir pour différencier des DCs.

### 3.3.4 Cellules de Langerhans (LCs)

Les LCs renferment les granules acides de Birbeck et expriment spécifiquement une lectine de type C, la langérine (CD207 ou CLEC4K). Les LCs interagissent avec les kératinocytes. Ces interactions font intervenir l'E-cadhérine une molécule d'adhérence (cadhérine 1). Matures, les LCs sous-régulent l'expression de l'E-cadhérine. Conséquemment, elles se détachent des kératinocytes, deviennent mobiles et traversent la membrane basale pour arriver au derme à partir duquel elles rejoignent la circulation lymphatique. Les LCs sur-régulent à ce moment l'expression des molécules du CMH-II, l'expression des molécules de co-stimulation et le CCR7 (Kissenpfennig et al., 2005).

Isolées après migration à partir de l'épiderme de la peau, les cellules de Langerhans sont plus efficaces en présentation croisée que l'ensemble du pool des DCs du derme (Polak et al., 2012). D'ailleurs, Klechevsky constate que les LCs induisent plus efficacement les lymphocytes T CD8+ que les DCs CD14<sup>-</sup>CD207<sup>-</sup>CD1a<sup>+</sup>, une population de DCs du derme (Klechevsky et al., 2008). Aussi, les LCs cocultivées, *in vivo*, avec des lymphocytes T CD4+ allogéniques naïfs peuvent induire leur prolifération et polariser la sécrétion des cytokines selon un profil Th2. Les LCs



exercent également des fonctions immunosuppressives et leur présence atténue les réponses immunitaires initiées par les cDCs du derme. Par exemple, en induisant la différenciation des lymphocytes T CD4+ en Treg, les LCs protègent la souris contre la dermatite de contact (Gomez de Agüero et al., 2012) et l'encéphalite auto-immune (Idoyaga et al., 2013). Les propriétés tolérogènes des LCs sont indépendantes du statut inflammatoire de l'épiderme dans lequel elles mûrissent. Par exemple, le mécanisme de tolérogénicité des cellules de Langerhans aux haptènes provient de la suppression de l'activation de la MAPK p38 (Ohtani et al., 2009).

### 3.3.5 Cellules dendritiques dérivées de monocytes (MDDCs) *in vitro*

*In vitro*, l'établissement de cultures de DCs immatures répond à différents impératifs. En premier lieu, ceci permet d'exploiter leurs capacités de capture et de présentation antigénique et de les comparer aux autres cellules présentatrices d'antigènes. Ensuite, l'établissement de telles lignées permet d'étudier les signaux qui modulent les fonctions de capture, de présentation antigénique et de susceptibilité à l'infection par un pathogène. D'ailleurs, dans mon étude, j'étudie l'interaction de 3 sous-types de MDDCs (les IL-4 DCs, MDDCs tolérogènes (TGF- $\beta$  DCs) et MDDCs inflammatoires (IFN- $\alpha$  DCs) ) avec HTLV-1.

#### 3.3.5.1 Les MDDCs immatures : Les IL-4 DCs

La combinaison du GM-CSF et de IL-4 permet de différencier à partir des monocytes des cellules qui ont les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des DCs classiques *in vivo* (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Ahn et Agrawal ont réussi à différencier des MDDCs à partir de monocytes en utilisant l'IL-13 au lieu de l'IL-4 (Ahn and Agrawal, 2005).

Comme les DCs immatures, *in vivo*, les IL-4 DCs capturent les antigènes, les appréhendent et les présentent aux lymphocytes T naïfs. Lorsque les IL-4 DCs sont en culture avec le TNF- $\alpha$  ou le ligand de CD40 (CD40L) pour une durée de 24 heures, ces IL-4 DCs immatures deviennent matures et sur-expriment les molécules de CMH-I, CMH-II, CD80, CD86 et ICAM-1. Matures, les IL-4 DCs peuvent induire les lymphocytes T (Sallusto and Lanzavecchia, 1994).

### 3.3.5.2 Les MDDCs tolérogènes

Le TGF- $\beta$  est une cytokine qui régule différents événements patho-physiologiques. Le TGF- $\beta$  est détecté au niveau des sites de l'inflammation. A ce niveau, le TGF- $\beta$  supprime l'activation et la maturation des DCs en inhibant la sur-régulation des molécules de co-stimulation (Yamaguchi et al., 1997). *In vitro*, le TGF- $\beta$  permet de différencier un sous-type de MDDCs : les MDDCs tolérogènes. Les DCs tolérogènes peuvent également être différenciées à partir des monocytes en présence de dexaméthasone ou de vitamine D3. Les DCs tolérogènes ont un phénotype immature et produisent de l'IL10 en quantité dix fois supérieure à celle produites par des IL-4 DCs rendues matures par stimulation au TNF- $\alpha$ , à l'IL-1 $\beta$  et par la prostaglandine E2 (PGE2) (Naranjo-Gómez et al., 2011). De même, les DCs tolérogènes ne reconnaissent pas les produits microbiologiques pro-inflammatoires. Le traitement des DCs tolérogènes avec l'agoniste du TLR4, le LPS, ne les mature pas. De plus, les DCs tolérogènes ne peuvent pas migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques en réponse aux chimiokines inflammatoires. La production de l'IL-12 par ces DCs n'est jamais détectée. Finalement, les DCs tolérogènes ne sont pas efficaces pour stimuler les lymphocytes T naïfs (Steinman et al., 2000). En effet, les DCs tolérogènes (après traitement à la rapamycine) induisent la différenciation des lymphocytes en lymphocytes Treg CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> (Naranjo-Gómez et al., 2011).

En conclusion, les DCs tolérogènes sont des cellules résistantes à la maturation et dont le phénotype est préservé, même en présence de signaux pro-inflammatoires. Ces DCs induisent la tolérance immune à travers différentes voies : la déplétion clonale des lymphocytes T et la déviation de la différenciation immune des lymphocytes à travers la génération des lymphocytes Treg. Ce sous-type de MDDCs dont je vais tester, au cours de mon étude l'interaction avec HTLV-1, mime à la fois les DCs tolérogènes retrouvées au niveau des muqueuses ainsi que les LCs.

### 3.3.5.3 Les MDDCs inflammatoires : IFN- $\alpha$ DCs

Il est possible de générer des IFN- $\alpha$  DCs après une exposition des monocytes à l'IFN- $\alpha$  et au GM-CSF pendant 3 jours. Ces IFN- $\alpha$  DCs sont caractérisés par leur phénotype semi-mature en comparaison aux IL-4 DCs immatures. Leur exposition aux agonistes des TLRs comme le LPS ou le PolyI:C les mature davantage. Dans ces conditions, elles sur-expriment encore davantage CD25,

CD40, CD80, CD83, CD86, des molécules d'adhérence (CD54, CD58) et les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (Farkas and Kemény, 2011).

Ces IFN- $\alpha$  DCs ont la capacité de produire des cytokines pro-inflammatoires (Farkas and Kemény, 2011). Les IFN- $\alpha$  DCs non stimulées produisent peu d'IL-12. Au contraire, leur stimulation par un simple brin d'ARN conduit à une production significative de l'IL-12, IL-23, IL-27, IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  (Farkas et al., 2008). Les IFN- $\alpha$  DCs sont capables de produire d'autres cytokines comme IL-8, IL-15, IL-18, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  (Farkas and Kemény, 2011). Les cytokines IL-12 et IL-23 produites par les IFN- $\alpha$  DCs maturées stimulent les lymphocytes afin de produire, à leur tour, les cytokines Th1 et Th2. De plus, les IFN- $\alpha$  DCs possèdent un potentiel supérieur aux IL-4 DCs pour la production des cytokines inflammatoires dont l'IL-12 (Scutera et al., 2009). Au contraire, les IFN-DCs produisent de faibles taux de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 (Farkas et al., 2008). En raison de leur phénotype semi-mature, les IFN- $\alpha$  DCs se caractérisent par une capacité supérieure à la capture et à la présentation antigénique par comparaison aux DCs immatures (Lapenta et al., 2006).

## 4 Interactions DCs et virus

A la suite d'une infection, la clairance des virus n'est souvent pas atteinte : certains virus établissent des infections chroniques asymptomatiques ou symptomatiques. Certaines de ces infections sont associées à des risques de développement de cancers et donc à une morbidité et une mortalité élevées. Le dénominateur commun à ces infections chroniques est la faible réponse immunitaire lymphocytaire (Guidotti and Chisari, 2006) et (Gandhi and Walker, 2002). De plus, au cours des infections chroniques, les virus peuvent détourner les fonctions des DCs. Ceci favorise d'ailleurs la persistance virale. Dans ce qui suit, je vais aborder des exemples de détournements des fonctions des DCs par de nombreux virus dont HTLV-1.

### 4.1 Les virus détournent les fonctions des cellules dendritiques

L'infection virale détourne les fonctions des DCs à travers, en premier, la baisse de la fréquence cellulaire des sous-types de DCs. Par exemple, l'infection des DCs, *in vitro*, par la souche Ankara du virus de la vaccine (MVA), conduit à la mort des DCs par apoptose ce qui contribue à réduire leur nombre. Ici, le MVA est obtenu à la suite de plus de 500 passages, *in vitro*, du virus de la vaccine sur des fibroblastes d'embryons de poulets (Guzman et al., 2012). De plus, des taux plus faibles de DCs myéloïdes et de pDCs sont observés chez les patients infectés par le VIH-1 (Donaghy et al., 2001), le VHC (Wertheimer et al., 2004) et le VHB (Xie et al., 2009) en comparaison aux individus non infectés. Au cours de l'infection par SIV (simian immunodeficiency virus), la déplétion sanguine des pDCs est due à la fois à la migration des pDCs vers les ganglions enflammés et à la mort des pDCs par apoptose (Brown et al., 2009).

Le détournement des fonctions des DCs se fait aussi à travers l'échappement des virus à la réponse IFN. Les mécanismes d'échappement incluent l'inhibition de la production de l'IFN de type I. L'étude de Mandl indique que, dans le cas de l'infection chronique par le VIH-1, la stimulation chronique des pDCs est associée à un risque élevé de progression vers la maladie SIDA dans la mesure où elle s'accompagne de la baisse de la production de l'IFN $\alpha$  en réponse à l'engagement des TLR 7 et 9 par les pDCs (Mandl et al., 2008). De même, l'altération de la production de l'IFN est ici corrélée à la charge provirale (Kamga et al., 2005). Cependant, à la suite du traitement anti-rétroviral des patients infectés par le VIH-1, le nombre des pDCs augmente, leur fonction est

restaurée et ces cellules produisent des concentrations normales d'IFN- $\alpha$  (Kamga et al., 2005). De même, la protéine multifonctionnelle VP35 de la souche Zaire du virus Ebola inhibe la sécrétion de l'IFN de type I par les DCs. L'infection par cette souche est d'ailleurs associée à une mortalité dans plus de 90% des cas (Leung et al., 2010).

Un autre moyen d'échapper à l'IFN revient à échapper aux fonctions restrictives anti-virales des ISGs. Par exemple, des mutations au niveau de sites particuliers de la nucléoprotéine du virus de l'influenza empêchent la reconnaissance de la nucléoprotéine de l'influenza par MxA (Ashenberg et al., 2017).

De plus, la protéine Vif du VIH-1 antagonise la restriction causée par l'induction d'APOBEC3G (un facteur de restriction de l'infection par le VIH-1 induit par l'IFN $\alpha$  dans les cellules infectées) à travers la dégradation d'APOBEC3G par le protéasome (Letko et al., 2015). Similairement, le VHB code pour une protéine non structurale X (HBx) qui diminue sélectivement et de manière dose-dépendante les taux d'APOBEC3G dans des cellules Huh-7. Ici, la co-expression d'HBx augmente l'externalisation d'APOBEC3G via les exosomes ce qui résulte en la diminution de ses taux d'expression intra-cellulaires et donc en l'échappement du VHB à son action anti-virale (Chen et al., 2017a).

De même, dans les DCs exprimant le récepteur DC-SIGN, la liaison du VIH-1 à DC-SIGN, conduit à la dissociation de TRIM5 $\alpha$  de DC-SIGN. TRIM5 $\alpha$  est un facteur de restriction de l'infection par les rétrovirus. TRIM5 $\alpha$  reconnaît des motifs au niveau des protéines des capsides virales puis interfère avec l'étape de décapsidation virale. TRIM5 $\alpha$  bloque la transcription inverse du génome viral (pour revue Sadler and Williams, 2008). Ici, cette dissociation de TRIM5 $\alpha$  de DC-SIGN est suffisante pour permettre l'infection productive des DC DC-SIGN+ (Ribeiro et al., 2016).

Enfin, l'échappement à la tetherine est un mécanisme développé par HTLV-1 : Ilinskaya a montré que l'expression de la tetherine est incapable de diminuer la transmission cellule-cellule d'HTLV-1 (Ilinskaya et al., 2013). Différents arguments pourraient expliquer les observations d'Ilinskaya. Tout d'abord, lors de la transmission cellule-cellule d'HTLV-1 (pour revue (Rizkallah et al., 2015)) via la synapse virologique ou le biofilm viral, le transfert des virions se fait de façon directionnelle et extrêmement efficace. De plus, au niveau de ces deux mécanismes de transmission, le virus se trouve concentré au niveau de la synapse virologique ou dans les agrégats viraux (biofilms). Enfin, les interactions des virions contenus dans une synapse ou au niveau du biofilm sont limitées avec le milieu extérieur qui renferme les cellules immunitaires. Dans le même

contexte, la protéine Vpu du VIH-1 antagonise l'effet de la tetherine à travers la sous-régulation de l'expression cellulaire de la tetherine (Van Damme et al., 2008).

L'empêchement par les virus de la maturation des DCs est encore un mécanisme qui permet de contourner les fonctions des DCs. Les expériences de Hertoghs prouvent que VIH-1 manipule le système immunitaire en empêchant la maturation des DCs au moment de l'infection. En effet, les DCs infectées par le VIH-1 ne sur-régulent ni les molécules de co-stimulation ni les marqueurs de maturation (CD83, CD86, CD80, HLA-DR) en comparaison aux DCs non infectées. C'est ce qui expliquerait pourquoi les DCs infectées par le VIH-1 ont une moindre capacité pour la stimulation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs (Hertoghs et al., 2015). De même, les expériences de Czubala prouvent qu'au cours des 12 premières heures post-infection par le VIH-1, la synthèse de l'IFN- $\beta$  par les MDDCs est faible. Le pic de la synthèse de l'IFN- $\beta$  n'a lieu, en moyenne qu'à 48 heures post-infection des MDDCs. Or, à ce moment, le provirus est déjà intégré dans le génome cellulaire. Ainsi, le virus échappe à la synthèse de l'IFN qui ne peut pas induire sa restriction (Czubala et al., 2016).

De même, les protéines ICP47 du virus de l'*Herpès simplex* de type 1 et HHV5 du cytomégalovirus (CMV) empêchent les DCs infectées d'induire efficacement les lymphocytes T primaires naïfs à travers l'inhibition de la présentation antigénique. En effet, ICP47 et HHV5 bloquent la protéine TAP. La protéine TAP a pour rôle le transport intracellulaire des peptides endogènes du cytosol vers la lumière du réticulum endoplasmique. L'inhibition de TAP empêche donc la translocation des peptides vers la lumière du réticulum endoplasmique et prévient donc leur association aux molécules du CMH-1 qui permet de les présenter à la surface de la cellule (Bauer and Tampé, 2002). Dans ces cas, les virus de l'*Herpès simplex* et le CMV échappent à l'immunité et peuvent établir une infection persistante.

L'inhibition de l'autophagie, mécanisme regroupant plusieurs voies de dégradation lysosomale des constituants cellulaires, constitue aussi un moyen par lequel le virus détourne les fonctions des DCs au profit de sa persistance. Par exemple, Blanchet a montré que l'inhibition de l'autophagie par le VIH-1 dans les DCs inhibe la présentation antigénique via les molécules du CMH-II. L'inhibition de l'autophagie dérégule également ici les réponses immunes innées : dans ce cas, l'exposition des DCs au LPS (agoniste du TLR4) s'accompagne d'une diminution de plus de 60% de la production du TNF- $\alpha$  en comparaison à la production du TNF- $\alpha$  par des DCs non infectées

mais stimulées au LPS. De plus, l'inhibition de l'autophagie s'accompagne de l'augmentation de la quantité internalisée de VIH-1 dans les DCs, ce qui se répercute sur l'augmentation de la transmission du VIH-1 des DCs aux lymphocytes T CD4+ (Blanchet et al., 2010).

Enfin, le profil de cytokines que les DCs sécrètent peut être altéré à la suite de l'infection virale. Les infections par VIH-1 (Donaghy et al., 2003), HCV (Dolganiuc et al., 2003) et HBV (van der Molen et al., 2006a) induisent la sur-régulation de l'IL-10 et la suppression de l'IL-12 et de l'IFN- $\alpha$  en réponse à diverses maturations ce qui pourrait affecter les défenses anti-virales précoces (Conry et al., 2009). D'ailleurs les DCs infectés par le VIH-1 (Granelli-Piperno et al., 2004), HCV (Bain et al., 2001) et HBV (van der Molen et al., 2004) stimulent moins l'activation et la prolifération des lymphocytes T en comparaison aux DCs en provenance d'individus non infectés. Il est néanmoins possible de reverser une faible stimulation allogénique chez les patients infectés par VIH-1 à travers la neutralisation de l'IL-10 produite par les DC (Dolganiuc et al., 2008).

#### 4.2 L'entrée par endocytose et les compartiments empruntés par le virus lors de son trafic dans les DCs le protègent

Le système endo-lysosomal des DCs assure la destruction des pathogènes en vue de la présentation antigénique. D'ailleurs, les fonctions de surveillance des DCs dépendent de leur capacité d'endocytose qui leur permettent d'internaliser puis de digérer les pathogènes puis de présenter les peptides antigéniques sur les molécules du CMH aux lymphocytes T. En effet, pour un pathogène, le lysosome d'une cellule présentatrice d'antigène est l'environnement intracellulaire le plus hostile du fait de sa grande concentration en protons (pH = 4), en protéases (plus de 50 protéases), lipases, DNases et hydrolases (Marsh and Helenius, 2006).

Néanmoins, pour les virus dont les protéines de fusion sont activées par un pH acide, comme le virus de l'influenza de type A (Basu et al., 2017) ou l'ASLV (pour Avian Sarcoma and Leukosis Virus) (Desai et al., 2017), le virus Chikungunya, le West Nile virus, des flavivirus comme le virus Zika et le virus de la fièvre jaune, l'endocytose constitue une étape d'entrée obligatoire. D'ailleurs, des agents lysosomotropes comme la chloroquine ou la bafiolomycine ou l'obatoclax (petite molécule qui induit la neutralisation rapide de l'environnement acide des vésicules des endolysosomes) inhibent la fusion virale de ces virus (Varghese et al., 2017). Au contraire, ni

l'obatoclax ni la chloroquine ne sont actifs contre les virus dont la fusion est pH-indépendante : les picornavirus comme le coxsackievirus A9, les échovirus 6 et les échovirus 7 le VIH-1 (Miyaeuchi et al., 2009), le CMV (Haspot et al., 2012), le métapneumovirus (Le Nouën et al., 2014) et Lassa (Goncalves et al., 2013). Dans ces cas, l'entrée du virus par endocytose peut se faire via les puits à clathrine, à cavéoline, via les rafts lipidiques, la voie de la flottiline, la macropinocytose ou la phagocytose.

L'entrée virale par endocytose médiée par la clathrine (CME) est un processus d'endocytose récepteur-dépendent qui requiert, en plus de la clathrine, la dynamine qui est une GTPase dont le rôle est la fission et la libération des vésicules à partir de la membrane plasmique (Ferguson and De Camilli, 2012). Le virus Lassa rentre par CME dans les MDDCs comme le confirment les expériences de Goncalves. Ici, la désorganisation du cytosquelette d'actine à travers le traitement des MDDCs avec la cytochalasine D, la latrunculin A et la jasplakinolide (stabilisateur des filaments d'actine) conduit à la baisse de l'infection productive des DCs, ce qui suggère le rôle de l'actine dans l'entrée virale. De même, la baisse de l'infection des DCs à la suite de leur traitement par la chlorpromazine (CPZ) ou par le dynasore, deux molécules qui perturbent respectivement l'assemblage des puits à clathrine au niveau de la membrane plasmique et qui inhibent la dynamyne (protéine cytoplasmique douée d'une activité GTPase et associée aux clathrines et impliquée dans la formation de ces vésicules lors de l'endocytose) suggère que l'entrée de Lassa se fait au niveau des puits de clathrine (Goncalves et al., 2013).

La macropinocytose est une voie indépendante de la clathrine. Dans les DCs, il s'agit d'un procédé constitutif (Garrett et al., 2000). La macropinocytose dépend de l'actine et des échangeurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  qui ont pour rôle d'acidifier le pH du cytosol afin d'activer les récepteurs tyrosine kinase à proximité de la membrane plasmique (Marsh and Helenius, 2006). C'est, par exemple, le mécanisme d'entrée du virus de la vaccine. L'entrée du virus de la vaccine dans les MDDCs est un processus actif qui requiert de l'ATP. D'ailleurs, le traitement des DCs avec l'antimycine A (AntiA), un inhibiteur de la chaîne de transport des électrons au niveau de la mitochondrie, ou par un chélateur du calcium, diminue l'entrée dans les deux cas. Dans le cas du virus de la vaccine, la macropinocytose dépend aussi du cholestérol. La macropinocytose dépend du phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) qui est impliqué dans les voies de signalisation aboutissant à la formation du macropinosome. D'ailleurs, l'entrée du virus de la vaccine dans les MDDCs est significativement réduite en présence de wortmannine, un inhibiteur du PI3K (Sandgren et al.,



2010). Les PI3K sont des kinases impliquées dans différentes fonctions cellulaires comme le trafic intracellulaire, la croissance, la prolifération, la différenciation et la motilité que nous avons déjà abordée en parlant de la migration des DCs (Zhou et al., 2017).

Haspot a prouvé que le CMV est, comme le virus de la vaccine, internalisé par macropinocytose dans les MDDCs. L'internalisation des virions dans les macropinosomes requiert la polymérisation de l'actine, l'activation des échangeurs Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> et l'activation des protéines kinases C (PKCs) qui régulent la signalisation cellulaire, ainsi que de l'intégrité des microdomaines de cholestérol. D'autre part, les expériences d'imagerie confocale d'Haspot ont permis de constater que l'accumulation des virions se fait dans les endosomes précoces, au niveau desquels les virions fusionneraient leur enveloppe avec la membrane plasmique. La capsidite serait libérée à proximité de la membrane nucléaire et se trouve associée aux microtubules (Halary et al., 2002a). L'association des capsides aux microtubules est d'ailleurs aussi observé pour les nucléocapsides du virus associé au sarcome de Kaposi (Sathish et al., 2009) et à l'*Herpes simplex* de type 1 (Sodeik et al., 1997).

En dépit du danger que représente le lysosome, des virus dont les protéines de fusion ne nécessitent pas une activation en milieu acide sont internalisés par endocytose dans les DCs. De plus, VIH-1 et CMV peuvent infecter productivement les DCs (cis-infection). Ceci suggère qu'un échappement de ces virus au milieu hostile des lysosomes peut avoir lieu.

#### 4.2.1 Les compartiments non conventionnels permettent aux virus d'échapper au lysosome

Les virus détournent souvent l'entrée par endocytose pour échapper au lysosome. Ainsi, le virus de la vaccine ne se retrouve pas, au niveau de la DC, dans un compartiment endosomal conventionnel : le virus de la vaccine ne co-localise à aucun moment avec les marqueurs des endosomes précoces (EEA1) ou avec la protéine membranaire associée au lysosome (Lamp2). Du fait que les macropinosomes non conventionnels ne fusionnent pas avec les lysosomes, le virus de la vaccine reste donc, dans ces conditions, à l'abri des mécanismes de détection et de destruction présents dans les endosomes classiques et les phagosomes. La présence du virus dans ce compartiment ne permet d'ailleurs ni la génération du peptide antigénique ni sa présentation par les molécules du CMH-I et du CMH-II. Ceci suggère donc que le virus reste potentiellement infectieux (Sandgren et al., 2010). De même, on peut suggérer que le virus qui persiste dans le compartiment non conventionnel de la DC perturbe la signalisation intra-cellulaire afin d'échapper

au trafic vers le lysosome. Enfin, le compartiment non conventionnel constituerait une niche qui protégerait le virus à la fois des réponses immunes à médiation humorale et cellulaires et de la dégradation dans le lysosome.

#### 4.2.2 VIH-1 échappe à la dégradation dans le lysosome

L'échappement du VIH-1 à la dégradation lysosomale lors de son trafic dans les DCs est aussi expliqué, comme pour le virus de la vaccine, par l'échappement viral à la dégradation dans le lysosome. En effet, Kwon a observé que VIH-1 est internalisé après sa liaison à DC-SIGN, une lectine exprimée en surface des DCs, dans un compartiment au niveau duquel il conserve son pouvoir infectieux (Nobile et al., 2005) si bien que VIH-1 peut ensuite être transmis aux lymphocytes T CD4+ (Kwon et al., 2002). Dans ce contexte, l'équipe de Piguet a caractérisé les compartiments au niveau desquels trafique VIH-1 dans les DCs. Les expériences d'imagerie confocale au niveau des DCs matures ont indiqué que 90 % de VIH-1 colocalise avec les tétraspanines CD81 contre seulement 10 % de VIH-1 qui colocalise avec le marqueur des lysosomes LAMP-1. De même, 80% du pool de VIH-1 dans les DCs matures colocalise avec CD81, CD82 et CD9, trois tétraspanines. Lorsque des DCs matures ayant capturé VIH-1 entrent en contact avec les lymphocytes T CD4+, elles redistribuent le CD81 et le CD9 vers la synapse infectieuse. Lors de la formation de la synapse infectieuse, CD81 et CD9 ne sont plus exprimés au niveau intra-cellulaire. Au contraire, une relocalisation de 90 à 100% de CD81 et de CD9 a lieu vers le zone de contact entre DCs et lymphocytes T. De plus, VIH-1 se retrouve également au niveau de la zone de contact DC-lymphocyte T ce qui favorise sa transmission inter-cellulaire de la DC vers le lymphocyte T (Garcia et al., 2005). D'ailleurs, les fonctions d'adhérence et de motilité des tétraspanines peuvent favoriser la transmission de VIH-1 (Yaseen et al., 2017).

De son côté, Yu a montré que les DCs matures concentrent, en l'espace de 90 minutes, VIH-1 dans un compartiment intra-cellulaire en forme de poche. Ce compartiment ne renferme aucun des marqueurs des endosomes précoces, lysosomes, compartiments de présentation antigénique et vésicules d'endocytose. Au contraire, ce compartiment renferme les tétraspanines CD81 et CD63. VIH-1 y est séquestré jusqu'à une période de 48 heures en l'absence de dégradation. Pour Yu, ce compartiment intra-cellulaire proviendrait de l'invagination de la membrane plasmique et resterait accessible à une variété de molécules de l'extérieur de la cellule. L'accumulation de VIH-1 dans ce compartiment est dépendante de l'actine mais indépendante des microtubules ce qui suggère

que cette structure est très dynamique : elle capturerait et transmettrait rapidement les virions VIH-1. Enfin, Yu a similairement confirmé que les DCs myéloïdes matures séquestrent le VIH-1 dans un compartiment dont les caractéristiques sont similaires à celui des MDSCs matures (Yu et al., 2008).

Enfin, Garcia a montré que le trafic de VIH-1 est différent entre DCs matures et immatures. En effet, au niveau des DCs immatures, VIH-1 se retrouve au niveau de vésicules situées à la périphérie des DCs. De plus, ces vésicules ne renferment pas les marqueurs CD81, CD82 et CD9 décrits lors de la capture de VIH-1 par les DCs matures (Garcia et al., 2005). A travers des expériences de microscopie électronique au niveau des DCs immatures, Wang a similairement observé une faible concentration de VIH-1 au niveau de vésicules de clathrine en surface des DCs immatures. Au contraire des DCs immatures, Wang a observé une importante concentration de virions VIH-1 dans des compartiments d'endocytose intracellulaires non conventionnels au niveau des DCs matures (Wang et al., 2007). Cette observation de Wang rejoint celle de Turville qui a également montré que les DCs matures renferment un grand nombre de virions dans de larges vésicules à localisation périnucléaire, alors que les DCs immatures retiennent un faible nombre de virions intacts dans des endosomes à proximité de la membrane plasmique (Turville et al., 2004). Notons, enfin, que des mécanismes d'échappement à la dégradation du VIH-1 se produisent au niveau des macrophages. En effet, bien que le virus et son co-récepteur se retrouvent simultanément dans l'environnement endosomal, la dégradation virale est retardée après l'internalisation dans les endosomes. Ceci permettrait au virus de compléter sa fusion (Gobeil et al., 2013). Dans ce contexte, Jouve a montré que l'accumulation du VIH-1 se fait au niveau des endosomes des macrophages lorsqu'ils ne sont pas acides. VIH-1 y conserve son pouvoir infectieux. Ces "endosomes non acides" ou "non conventionnels" correspondent ici aux corps multi-vésiculaires. Ils sont riches en molécules du CMH-II, cholestérol et en tétraspanines CD63, CD81 et CD82 (Kramer et al., 2005). Ces endosomes n'expriment cependant pas le marqueur Lamp-1 (Kramer et al., 2005). Enfin Jouve a montré que c'est l'absence de recrutement de la V-ATPase au niveau de ces compartiments qui empêche leur acidification. D'ailleurs, le pH des endosomes non conventionnels des macrophages se situe autour de 6.8. Un tel pH permet d'expliquer la survie ainsi que la conservation du pouvoir infectieux de VIH-1 (Jouve et al., 2007a).

### 4.3 Les DCs disséminent les virus

La lectine de type C, DC-SIGN est exprimée spécifiquement sur les MDDCs mais aussi sur les macrophages et les lymphocytes B activés. DC-SIGN, est un récepteur de pathogènes à large spectre : DC-SIGN lie les enveloppes de différents virus comme le virus de la dengue (Navarro-Sanchez et al., 2003), Ebola (Simmons et al., 2003), Marburg et Coronavirus (Marzi et al., 2004), puis les transmet aux lymphocytes T (Geijtenbeek and van Kooyk, 2003). L'expression de DC-SIGN est liée à la différenciation des MDDCs en présence de l'IL-4. Néanmoins, l'expression de DC-SIGN est régulée négativement par l'IFN et le TGF- $\beta$  (Relloso et al., 2002). Les pDCs ainsi que les LCs de l'épithélium vaginal n'expriment pas DC-SIGN (Jameson et al., 2002).

A la suite de l'interaction DC-SIGN- gp120, VIH-1 est séquestré dans des compartiments non conventionnels des DCs (Geijtenbeek et al., 2000a) et (Yu et al., 2008). En migrant vers les ganglions lymphatiques, les DCs transportent VIH-1 puis le transmettent aux lymphocytes T CD4+ selon un mécanisme qui implique l'intervention de DC-SIGN (Geijtenbeek et al., 2000b) et qui requiert un contact cellule-cellule entre la DC et le lymphocyte T (Kwon et al., 2002). Les récepteurs de VIH-1 CD4, CCR5 et CXCR4 présents à la surface du lymphocyte T se concentrent au niveau de la synapse infectieuse DC-lymphocyte T. Il en est de même de VIH-1 qui est aussi recruté au niveau du site de contact DC-lymphocyte T. La concentration de VIH-1 et de ses récepteurs facilite ainsi la transmission virale (McDonald et al., 2003). Ce mécanisme de capture du virus par la DC puis de sa transmission en l'absence de l'infection productive de la DC porte le nom de "trans-infection". La libération de VIH-1 endocyté peut se faire dans le milieu extracellulaire en association avec des vésicules d'exocytose. Ces exosomes seraient d'ailleurs 10 fois plus infectieux que le virus libre (Wu and KewalRamani, 2006). Similairement, après la liaison entre DC-SIGN et la glycoprotéine de l'enveloppe E2 de VHC (Gardner et al., 2003), VHC contournerait, comme VIH-1, le mécanisme de présentation antigénique et échapperait ainsi à la dégradation dans le lysosome (Ludwig et al., 2004). En effet, les particules du VHC résistent jusqu'à 24 heures dans les compartiments des DCs qui facilitent, dans un second temps leur dissémination. Ces deux exemples illustrent bien le fait que les DCs constituent un réservoir viral à partir duquel VHC et VIH-1 infectent respectivement les hépatocytes ainsi que les lymphocytes T CD4+.

#### 4.3.1 Les DCs ne transmettent pas similairement VIH-1 aux lymphocytes T

La transmission virale des DCs aux lymphocytes T varie en fonction de la nature de la DC. Par exemple, les pDCs transmettent moins efficacement VIH-1 en comparaison aux DCs myéloïdes (Groot et al., 2006).

De même, la transmission virale de VIH-1 des DCs aux lymphocytes T varie suivant le status immature vs mature de la DC : les DCs matures transmettent davantage VIH-1 aux lymphocytes T en comparaison aux DCs immatures. La différence de transmission de VIH-1 des DCs aux lymphocytes T reviendrait à la quantité de virions endocytés par chacun des deux sous-types de DCs. En effet, les expériences entreprises par Dong montrent que les MDSCs maturées au LPS, un agoniste du TLR4, endocytent entre 2 à 3 fois davantage VIH-1 en comparaison aux IL-4 DCs immatures si bien que la transmission de VIH-1 à partir des MDSCs matures aux lymphocytes T est supérieure d'un facteur de 4 à la transmission de VIH-1 à partir des IL-4 DCs immatures (Dong et al., 2007). Cette démonstration de Dong rejoint les observations de Wang qui avait montré que les DCs matures qui renferment un grand nombre de virions dans de larges vésicules à localisation périnucléaire transmettent davantage VIH-1 aux lymphocytes T par comparaison aux DCs immatures qui retiennent un faible nombre de virions dans des endosomes à proximité de la membrane plasmique (Wang et al., 2007). Similairement, les expériences entreprises par Sanders confirment bien la supériorité des DCs matures en termes de transmission. Sanders a commencé par maturer différemment les DCs moyennant différents stimuli. Dans son étude, les DC1 correspondent aux DCs présentant un phénotype mature (sur-régulation de CD80, CD86 et HLA-DR) et qui sont susceptibles d'induire une réponse immune de type Th1 au contraire des DC2, susceptibles d'induire une réponse de type Th2. Sanders note ici que les DC1 sont davantage susceptibles de transmettre le VIH-1 aux lymphocytes T CD4+ en comparaison aux DC2 (Sanders et al., 2002). DC-SIGN n'est pas le seul récepteur impliqué dans la trans-infection des lymphocytes T par VIH-1. En effet, les résultats obtenus par Wang montrent que l'inhibition de DC-SIGN ne réduit la transmission de VIH-1 que de 50%, aussi bien à partir des MDSCs immatures qu'à partir des MDSCs matures. De même, l'étude de Granelli-Piperno a montré que le blocage de DC-SIGN n'empêche pas la transmission du VIH-1 par les MDSCs aux lymphocytes T (Granelli-Piperno et al., 2005). Enfin, puisque la maturation des DCs induit la sous-régulation de DC-SIGN alors que la trans-infection de VIH-1 est augmentée, ceci suggère l'existence d'un autre récepteur des

MDDCs qui participerait au mécanisme de la trans-infection. Siglec-1 (sialic acid binding Ig-like lectin 1) serait ce récepteur (Izquierdo-Useros et al., 2012).

Siglec-1 fonctionne comme un récepteur aspécifique de toutes vésicules, exosomes ou virus qui renferment du sialyllactose dans leur membrane (Izquierdo-Useros et al., 2012). Contrairement à la capture via DC-SIGN, la capture via Siglec-1 est un mécanisme indépendant des protéines de l'enveloppe virale. Ainsi, Siglec-1 peut lier spécifiquement VIH-1 et les vésicules qui renferment du sialyllactose (Izquierdo-Useros et al., 2012). Comme Siglec-1 n'est pas sous-régulé lors de la maturation des DCs, il serait responsable de l'augmentation de la trans-infection des lymphocytes T à partir des DCs matures. En effet, le prétraitement des MDDCs matures avec un anticorps monoclonal anti-Siglec1 abolit leur capture de VIH-1. Au contraire, le traitement des MDDCs matures par du mannane (en vue du blocage de DC-SIGN) n'a aucun effet sur la capture de VIH-1 (Izquierdo-Useros et al., 2012). Enfin, à travers des expériences de microscopie confocale, Izquierdo-Useros a suggéré que l'augmentation de la trans-infection de VIH-1 par les DCs matures se ferait à travers l'accumulation de Siglec-1 au niveau de la synapse virologique formée entre les DCs matures et les lymphocytes T CD4+. En conclusion, ce seraient à la fois DC-SIGN et Siglec-1 qui contribueraient à la trans-infection par VIH-1 des lymphocytes T CD4+ à partir des DCs immatures. Néanmoins, ce serait Siglec-1 qui contribuerait principalement à la trans-infection à partir des DCs matures.

#### 4.4 L'infection productive : lorsque la DC produit le virus qu'elle doit éliminer

Une fois capturés, les virus peuvent infecter productivement les DCs. Ce procédé est connu sous le nom de cis-infection. Au cours de la cis-infection, l'expression des antigènes viraux peut interférer avec les voies de signalisation des DCs ou altérer leurs fonctions.

L'infection productive d'une MDDC par le VIH-1 passe par deux phases :

- La première phase correspond aux 24 premières heures de l'exposition des DCs au virus : le virus capturé se retrouve dans un compartiment non conventionnel à partir duquel il peut être transféré par trans-infection (Kwon et al., 2002).

- La seconde phase qui débute à partir de la 24<sup>ème</sup> heure à l'exposition virale : Le virus infecte productivement et se réplique *de novo* dans les DCs. L'inhibiteur de la transcriptase inverse, AZT inhibe ici la néosynthèse de l'ADN proviral (Nobile et al., 2005) et (Turville et al., 2004).

Le tableau 5 ci-dessous éclaire sur la capacité de 8 virus à productivement infecter ou pas les DCs. Il est important de noter que toutes ces expériences ont été réalisées avec du virus libre.

VIH-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Une fréquence d'infection entre 0.02 et 11.2% avec une moyenne à 2.67% est reportée <i>ex vivo</i> sur des cellules de Langerhans isolées à partir de 62 individus sains (Kawamura et al., 2003).</li> <li>- Un résultat similaire est retrouvé par Czubala pour l'infection des LCs différenciées à partir des monocytes par du virus libre ou par des pseudo-virus (VSV-G HIV-GFP) du VIH-1. Czubala note que c'est le TGF-<math>\beta</math> (qui permet la différenciation des LCs) qui cause la répression de l'infection des LCs par le VIH-1 (Czubala et al., 2016).</li> <li>- Pour de Witte, la langérine empêcherait l'infection des LCs par le VIH-1 à travers l'adressage des virus vers des compartiments acides qui le dégradent (de Witte et al., 2007).</li> <li>- Les DCs myéloïdes et les pDCs sont productivement infectés par le VIH-1 (pour revue, Wu and KewalRamani, 2006).</li> <li>- Les études <i>in vitro</i>, indiquent, qu'en moyenne 1 à 3% des mDCs et des pDCs en provenance d'individus sains peuvent être infectés par le virus libre VIH-1 (Smed-Sørensen et al., 2005).</li> <li>- Les MDDCs immatures différenciées à partir des progéniteurs CD34+ sont plus sensibles à l'infection productive par VIH-1 que les DCs matures (Canque et al., 1999).</li> <li>- Les MDDCs maturées au LPS ne supportent pas l'infection par VIH-1. Pour Dong, la restriction des MDDCs maturées au LPS se situe à une étape post-intégration. En effet, dans les MDDCs maturées au LPS, le nombre de copies d'ADN de VIH-1 est supérieur à celui des IL-4 DCs. Néanmoins, c'est le nombre de copies d'ADN de VIH-1 intégré qui est</li> </ul>
-------	--

	<p>réduit au niveau des MDDCs matures en comparaison aux MDDCs immatures (Dong et al., 2007).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- La fréquence de l'infection productive par le VIH-1 dans les DCs est, <i>in vivo</i>, 10 à 100 fois inférieure à celle des lymphocytes T CD4+ infectés (McIlroy et al., 1995).</li> </ul>
<p>Virus de l'hépatite C (VHC)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Les DCs ne supportent pas la réplication de VHC : aucune protéine virale n'est détectée après coculture des MDDCs avec VHC infectieux (Marukian et al., 2008).</li> <li>- Dans les premières études sur l'infection productive des DCs par VHC, l'ARNm de VHC qui est retrouvé dans les pDCs et les mDCs isolés du sang de patients infectés par le virus correspondrait à la capture de VHC par les DCs et non pas à l'infection productive des DCs (Goutagny et al., 2003).</li> <li>- Cependant, les MDDCs supporteraient les premières étapes du cycle viral de VHC : lorsque des MDDCs sont incubées avec le sérum d'individus infectés par VHC, des intermédiaires de réplication sont détectés au niveau des MDDCs (Navas et al., 2002).</li> <li>- L'étude de Goutany sur 24 individus infectés par VHC révèle également que des intermédiaires de réplication sont détectés dans les DCs de 3 individus (Goutagny et al., 2003).</li> </ul>
<p>Virus de l'hépatite B (VHB)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- les MDDCs ne supporteraient l'infection productive lorsqu'elles sont cultivées avec VHB recombinant (rHBV-rLuc) (Untergasser et al., 2006).</li> <li>- L'ADN de VHB détecté au niveau des MDDCs reflète davantage l'attachement du virus à la surface cellulaire ou la capture antigénique que l'infection productive de la DC (van der Molen et al., 2006b).</li> <li>- Néanmoins, chez un individu infecté par HBV, les DCs ont, <i>in vivo</i>, une moindre capacité à induire les lymphocytes T. Ceci serait lié à l'absence</li> </ul>



	de sur-expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 lors de la maturation des DCs <i>in vivo</i> (van der Molen et al., 2006b).
Cytomégalo­virus (CMV)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 80 à 90 % des IL-4 DCs sont susceptibles à l'infection par le CMV libre à condition que le CMV soit produit au niveau d'une culture de cellules endothéliales (Riegler et al., 2000).</li> <li>- le blocage de DC-SIGN est suffisant pour réduire l'infection productive des MDDCs par le CMV libre (Halary et al., 2002a)</li> </ul>
Virus Uukuniemi (UUKV)	- L'engagement de DC-SIGN par le virus libre UUKV, un phlébovirus, initie une cascade de signalisation qui résulte en l'endocytose et dans le trafic du complexe récepteur-virus. Après internalisation, DC-SIGN délivre le virus UUKV dans les endosomes précoces. Ensuite, le virus se dissocie de DC-SIGN et arrive jusqu'aux endosomes tardifs à partir desquels la capsid virale pénètre dans le cytosol. Cette internalisation précède l'infection des MDDCs dont le taux d'infection peut atteindre 70% (Lozach et al., 2011b).
Virus de la Dengue	- Plus de 30% des MDDCs immatures sont infectées par le virus libre de la dengue. Au contraire, moins de 1% des LCs sont infectées par le virus de la dengue (Lozach et al., 2003).
Echovirus et Coxsackie virus B	- Les DCs BDCA1+ ont des susceptibilités différentes à l'infection avec différents entérovirus : elles ne s'infectent pas par le Coxsackie virus B (CVB) en raison probablement de l'absence du récepteur d'entrée CAR (récepteur du coxsackie et adénovirus). Au contraire, elles s'infectent par les Echovirus (EVs) (Schulte et al., 2013).
Virus de la rougeole	- Le virus de la rougeole se réplique faiblement dans les DCs immatures mais de manière intense dans les DCs matures.

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- L'infection des DCs matures par le virus libre de la rougeole diminue leur capacité à produire de l'IL-12. Aussi, les lymphocytes T ne peuvent pas proliférer en réponse à la stimulation par des DCs infectées.</li> <li>- De plus, le virus de la rougeole induit l'apoptose des DCs infectées (Fugier-Vivier et al., 1997).</li> </ul>
--	--

Tableau 5 : Interaction DC/ virus. Ce tableau précise les données de la littérature en faveur ou pas de l'infection productive des DCs par VIH, VHC, VHB, CMV, UUKV, la dengue, Echovirus, coxsackie virus B et le virus de la rougeole.

#### 4.4.1 Les agents lysosomotropes modulent l'infection productive

L'infection productive d'une DC peut être modulée à travers le traitement de la cellule par des agents lysosomotropes qui altèrent le pH des endosomes. Dans ce contexte, le pH des endosomes dépend de l'activité coordonnée de deux enzymes : la NADPH oxydase NOX2 et de la V-ATPase (Yurkiv et al., 2016). Les DCs expriment NOX2 (Elsen et al., 2004) qui permet la production de ROS (reactive oxygen species). Il en résulte en la consommation des protons et l'alkalinisation des vésicules (Savina et al., 2006) et (Vorobjeva et al., 2017). Au niveau des DCs immatures, la production de ROS se fait en continu. Combinée à une faible activité de la V-ATPase, la production de ROS conduit, au niveau de ces DCs immatures, à l'alkalinisation du phagosome (Savina et al., 2006). C'est Rac2 qui détermine l'assemblage subcellulaire de NOX2 aux phagosomes. D'ailleurs, en l'absence de Rac2, la production de ROS par les phagosomes des DCs CD8<sup>+</sup> est abolie (Savina et al., 2009). Le DPI (pour chlorure de diphenyleiodonium), un inhibiteur des enzymes NOX permet, au contraire, l'acidification rapide des compartiments d'endocytose (Dong et al., 2009). La stimulation des neutrophiles par le DPI, entraîne un arrêt rapide de la production de ROS (pic d'activité en 30 minutes) ce qui coïncide avec l'acidification rapide des endosomes (Segal, 2006). Enfin, l'enzyme V-ATPase est composée de deux complexes V0 et V1 (Oot et al., 2017). V0 est insérée au niveau des membranes et est responsable de l'échange des protons à partir du lumen des compartiments. La sous-unité V1 de la V-ATPase participe à la liaison et à l'hydrolyse de l'ATP (Chen et al., 2017b).

A travers la neutralisation du pH des endosomes des DCs, les agents lysosomotropes peuvent, en premier, bloquer l'étape de fusion pour les virus qui requièrent un pH acide pour stimuler l'activité

fusogène de leurs protéines de fusion. Ce serait le cas des virus de l'influenza (Marois et al., 2014) ou le VSV (virus de la stomatite vésiculaire).

Ensuite, lorsque l'acidification des endosomes est empêchée, le pH vacuolaire deviendrait favorable à la survie des pathogènes. Par exemple, en bloquant le recrutement de la V-ATPase au niveau des endosomes, VIH-1 empêche l'acidification des endosomes ainsi que la fusion endosome-lysosome ce qui contribue à la survie de VIH-1 dans les endosomes (Jouve et al., 2007b). Enfin, l'activité lysosomotrope peut aussi contribuer à l'augmentation de l'infection productive. Dans ce contexte, Fredericksen a testé l'influence de la neutralisation des endosomes par la bafilomycine, un inhibiteur de l'ATPase vacuolaire sur l'infection productive de la lignée cellulaire, Hela Magi (HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -galactosidase) par VIH-1. Il a montré que le blocage de l'acidification des endosomes augmente l'infection d'un facteur de 50 à travers l'empêchement de la dégradation du virus dans les lysosomes (Fredericksen et al., 2002). Ainsi, le blocage ou la diminution de la dégradation des particules infectieuses endocytées à travers l'altération du pH endosomal leur permet de fusionner avec les membranes cellulaires, de déposer leur génome dans le cytoplasme de la cellule hôte ce qui conduit à l'infection productive.

Il est enfin possible de partager les inhibiteurs de l'acidification des endosomes entre trois catégories (tableau 6) :

Catégorie	Exemple	Mécanisme d'action
Bases faibles	Chloroquine, amantadine, chlorure d'ammonium	En captant les protons, les bases faibles se neutralisent l'environnement acide des vésicules d'endocytose
Altérateur du pH	Monensine	Ce composé échange un ion potassium ou sodium contre un proton
Inhibiteurs de l' H <sup>+</sup> /ATP vacuolaire	Bafilomycine et concanamycine A ou B	Ils inhibent la pompe vacuolaire V-ATPase. Cette pompe est responsable de l'acidification du système vacuolaire (Savina et al. 2006)

Tableau 6 : Classification des inhibiteurs de l'acidification des endosomes. Ce tableau indique les trois catégories auxquelles appartiennent les inhibiteurs de l'acidification des endosomes ainsi que le mécanisme d'action propre à chacune des catégories.

## 5 Interactions DCs et HTLV-1 : Qu'en savons-nous ?

### 5.1 HTLV-1 détourne les fonctions des DCs

HTLV-1 est susceptible de détourner les fonctions des DCs à travers le blocage de leur maturation. Makino a montré que les DCs immatures différenciées à partir de monocytes infectés par HTLV-1 perdent leur capacité de capture antigénique que mime la baisse de la capture du dextran. Ensuite, les DCs matures différenciées à partir de monocytes infectés par HTLV-1 ne stimulent pas la prolifération des lymphocytes T autologues CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, au contraire de MDDCs matures contrôles (Makino et al., 2000).

Mostoller s'est intéressé à l'influence de la protéine Tax purifiée sur les DCs. Il a montré que Tax induit l'activation des DCs à travers l'augmentation des transcrits de CD80 et de CD86. Cependant, Mostoller constate que cette augmentation des ARNm ne s'accompagne pas de la synthèse des protéines CD80 et CD86 correspondantes (Mostoller et al., 2004). Ce résultat suggère ici que les DCs infectées par HTLV-1 n'exprimeraient pas les molécules de co-stimulation et seraient conséquemment déficientes dans leur capacité à stimuler les lymphocytes T.

Nascimento a également analysé l'activation et la différenciation des DCs à partir des monocytes de patients infectés par HTLV-1. Il a montré que la différenciation des monocytes de patients sains en MDDCs puis la stimulation des MDDCs par le TNF- $\alpha$  s'accompagne d'une sur-expression des marqueurs de co-activation CD83, CD86 et HLA-DR. Au contraire, la sur-expression de CD83, de CD86 ou de HLA-DR n'est pas observée après maturation des MDDCs différenciées à partir des monocytes de patients infectés par HTLV-1. D'ailleurs, ces MDDCs ne peuvent pas stimuler les lymphocytes T allogéniques. Similairement à Makino et Mostoller, Nascimento conclut que l'altération de la maturation des DCs chez les patients infectés par HTLV-1 contribue au développement des maladies associées au rétrovirus (Nascimento et al., 2011).

HTLV-1 a aussi élaboré sa propre stratégie pour échapper au système IFN. Hishizawa retrouve chez les patients ATL des taux réduits de pDCs et de DCs myéloïdes en comparaison aux taux respectifs chez les individus sains. Chez les patients ATL, la production de l'IFN- $\alpha$  produit par les PBMCs est aussi réduite. Les pDCs purifiées des individus infectés par HTLV-1 sont défectueuses dans leur capacité à produire de l'IFN- $\alpha$  lorsqu'elles sont cultivées en présence du virus de l'*Herpes simplex* irradié pour 24 heures (Hishizawa et al., 2004).

Fenzia a montré que l'expression par transduction de la protéine virale p30 inhibe significativement l'expression de l'ARNm des ISGs étudiés (MxA, APOBEC3G, OAS), à la fois sur des monocytes humains primaires et sur des MDDCs, *in vitro*, à la suite d'une stimulation par le PolyI:C ou le LPS. Au contraire, l'ablation de p30 du clone moléculaire d'HTLV-1 conduit à une diminution significative de l'inhibition des ISGs à la suite de l'induction des TLR3 et des TLR4. Enfin, Fenzia démontre que p30 inhibe l'initiation et l'élongation des transcrits IFN- $\alpha$ 1, IFN- $\beta$  ainsi que les gènes induits par l'agoniste du TLR4 (Fenzia et al., 2014).

Le résultat de Fenzia rejoint celui de Datta qui avait montré que la protéine virale p30 exprimée par transfection dans la lignée monocyttaire THP-1 facilitait la persistance d'HTLV-1. Ici, l'interaction de la protéine virale p30 avec PU.1, un facteur de transcription exprimé dans les macrophages, DCs, lymphocytes B et neutrophiles inhibe l'activité transcriptionnelle de PU.1. Ceci se traduit en la diminution de l'expression du TLR4 de la surface des cellules THP-1 et en la diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires comme le MCP-1, le TNF- $\alpha$ , l'IL-8. De plus, Datta note, dans ce cas, l'augmentation de la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 par les cellules THP-1 (Datta et al., 2006). En conclusion, les résultats de Datta et de Fenzia suggèrent que p30 interfère avec la signalisation des TLRs. Ceci résulte en la diminution de l'expression des ISGs, en la diminution de la production des cytokines inflammatoires mais en l'augmentation de la production de l'IL-10.

## 5.2 La nature des compartiments empruntés par HTLV-1 dans les MDDCs est méconnue

Ceccaldi a examiné par microscopie électronique le trafic d'HTLV-1 dans les DCs après leur contact avec des lignées lymphoïdes chroniquement infectées par HTLV-1 (C91-PL ou MT-2). Après trois heures de contact, ces lignées chroniquement infectées par HTLV-1 établissent un contact intercellulaire étroit avec les MDDCs. Par microscopie électronique, des particules virales sont observées dans la zone de contact formée entre les membranes plasmiques des DCs et des lymphocytes. Cette zone de contact ressemble à la synapse virologique décrite par Igakura (Igakura et al., 2003). Au contraire, cette zone de contact DC-lymphocyte peut constituer, par d'autres endroits, une interface discontinue entre les membranes des DCs et des lymphocytes. Ceccaldi note aussi que certaines particules virales sont internalisées dans des structures vacuolaires au niveau des MDDCs. Ces particules virales peuvent se retrouver au contact des membranes vacuolaires dans les DCs. Néanmoins, aucune caractérisation phénotypique ou

biochimique supplémentaire n'est fournie pour caractériser la nature de ces vacuoles. A la suite de ces observations microscopiques, Ceccaldi a suggéré que l'entrée d'HTLV-1 dans les DCs se faisait par endocytose sans préciser le mécanisme d'entrée (Ceccaldi et al., 2006).

Par extrapolation des résultats de Garcia qui avait montré la colocalisation du VIH-1 et du marqueur CD81 des tétraspanines au niveau des vésicules des DCs matures, nous avons étudié la colocalisation d'HTLV-1 et de la tétraspanine CD82 dans trois sous-types de DCs. Parmi la variété des tétraspanines (CD53, CD81, CD82 et CD231) dont nous pouvions tester la colocalisation avec HTLV-1, notre choix s'est porté sur la tétraspanine CD82. La tétraspanine CD82 est une molécule de costimulation dépendante du cytosquelette. CD82 est aussi associée à 2 Rho GTPases : le facteur Vav1 et la protéine adaptatrice SLP76. Ces associations pourraient suggérer que ces Rho GTPases participent à la signalisation de CD82. D'ailleurs, l'inactivation des Rho GTPases ainsi que l'inhibition spécifique de RhoA, Rac1 ou Cdc42 inhibent les changements morphologiques liés à l'engagement de CD82. Néanmoins, l'inactivation des Rho GTPases ne porte pas atteinte à l'association de CD82 avec le réseau d'actine, ce qui laisse, ici, suggérer l'implication de CD82 dans le trafic intracellulaire (Delaguillaumie et al., 2004).

La raison de mon choix pour l'étude de la colocalisation HTLV-1 et CD82 réside dans le fait que Mazurov a décrit la colocalisation de CD82 avec la protéine MA d'HTLV-1 au niveau interne de la membrane plasmique des lymphocytes T. Ceci peut suggérer que CD82 facilite la transmission d'HTLV-1 (Mazurov et al., 2006). De plus, des mutations de la région IL (pour Inner Loop) de CD82 affectent l'interaction Gag/CD82. Similairement, Pique a montré qu'Env d'HTLV-1 colocalise avec CD82 au niveau des cellules chroniquement infectées MT2. C'est d'ailleurs cette interaction qui facilite l'incorporation d'Env dans la particule virale. Pique ne précise néanmoins pas les domaines protéiques d'Env et de CD82 impliqués dans l'interaction CD82-Env (Pique et al., 2000). Ainsi, ces deux interactions faciliteraient la localisation d'HTLV-1 dans des compartiments enrichis en tétraspanines CD82+

### 5.3 Les DCs capturent et disséminent HTLV-1

Ceccaldi a mis en évidence que c'est DC-SIGN qui facilite la capture d'HTLV-1 par les MDDCs. (Ceccaldi et al., 2006). Ceccaldi a aussi confirmé que la glycoprotéine de l'enveloppe d'HTLV-1 ne lie pas directement DC-SIGN, au contraire de ce qui est noté pour différents virus comme

Marburg (Marzi et al., 2004), Ebola (Alvarez et al., 2002), Dengue (Navarro-Sanchez et al., 2003), VIH-1 (Geijtenbeek et al., 2000b), CMV (Halary et al., 2002b), HCV (Lozach et al., 2003) et les phlébovirus (Lozach et al., 2011a). Cette absence de liaison d'Env à DC-SIGN est donc une particularité qui distingue HTLV-1 des autres virus. Dans la mesure où Env d'HTLV-1 interagit directement avec les HSPGs (héparanes sulfates protéoglycanes), NRP-1 (neuropiline-1) et Glut-1, les trois récepteurs d'HTLV-1, DC-SIGN jouerait donc le rôle d'un cofacteur qui stabiliserait davantage l'interaction entre lymphocytes T infectés et cellules cibles (pour revue (Jones et al., 2011) ). En revanche, l'expression de DC-SIGN au niveau de la lignée B-THP-1 (HSPG-, NRP-, Glut+) augmente la capture du virus libre HTLV-1. Inversement, au niveau des MDDCs, l'usage d'un anticorps bloquant anti-DC-SIGN réduit la capture du virus libre HTLV-1 d'un facteur de 5. Pour Jain, Glut-1, contrairement à DC-SIGN ne participe pas à la capture virale (Jain et al., 2009). Cette conclusion rejoint celle de Takenouchi, pour qui Glut-1 n'est pas le récepteur primaire d'HTLV-1 bien qu'il soit impliqué dans sa transmission lors d'un contact cellule-cellule (Takenouchi et al., 2007) et de Manel qui prouve que la capture virale n'est pas affectée lorsque le récepteur Glut-1 est inhibé par la cytochalasine B (Manel et al., 2005).

Jain a ensuite cultivé des DCs avec du virus libre HTLV-1 pendant deux heures puis avec des lymphocytes T autologues. Après coculture, les taux intracellulaires de la protéine de matrice p19 sont examinés dans les lymphocytes T. En l'absence d'inhibition de DC-SIGN, 50% des lymphocytes T expriment la protéine virale p19. L'inhibition de DC-SIGN à travers le prétraitement des MDDCs avec un anticorps anti-DC-SIGN réduit à 26% le pourcentage de lymphocytes T exprimant la protéine virale. Ainsi, DC-SIGN serait ainsi particulièrement impliqué dans la transmission d'HTLV-1 aux lymphocytes T. Enfin, HTLV-1 utiliserait DC-SIGN à deux niveaux dans le but de promouvoir sa réplication et sa pathogenèse. Tout d'abord, au cours des phases d'infection précoce, lorsque les DCs migrent vers les ganglions lymphatiques, DC-SIGN faciliterait la transmission d'HTLV-1 aux lymphocytes T (mécanisme de trans-infection). Ensuite, aussitôt que l'infection des lymphocytes a eu lieu, HTLV-1 se transmettrait des lymphocytes T aux DCs via DC-SIGN (Jain et al., 2009). Jones a aussi étudié la transmission d'HTLV-1 aux lymphocytes T à partir des DCs. Pour cela, elle a exposé des pDCs et des DCs myéloïdes à du virus HTLV-1 libre avant de les cultiver avec des lymphocytes T autologues. Ici, les lymphocytes T autologues internalisent le virus et s'infectent. Les observations de Jones lui ont permis de conclure que les DCs pouvaient transmettre HTLV-1 aux lymphocytes T dans les 7 premières

heures suivant l'exposition au virus. Les DCs non infectées participent ainsi à la "trans-infection" des lymphocytes T (Jones et al., 2008). Dans notre laboratoire, Alais a enfin étudié la transmission d'HTLV-1 aux lymphocytes T après infection des MDDCs par du biofilm viral (le biofilm est un agrégat infectieux à la surface de la cellule hôte riche en protéines et hébergeant HTLV-1). Ses résultats ont confirmé que les MDDCs productivement infectées transmettaient le virus aux lymphocytes T (Alais et al., 2015). Toutes ces expériences prouvent que les MDDCs sont susceptibles de capturer HTLV-1 et de le transmettre aux lymphocytes T. Cependant, toutes ces expériences ont été réalisées avec un seul sous-type de DCs. Or, comme je l'ai précédemment décrit, plusieurs sous-types de DCs existent dans l'organisme. On peut donc nous demander si ces résultats sont extrapolables à l'ensemble des DCs.

#### 5.4 Les DCs s'infectent productivement par HTLV-1

Des études contradictoires sur l'infection des DCs par HTLV-1 sont reportées. L'équipe de Grusky a conclu en 1995 que les DCs ne sont pas susceptibles à l'infection virale. Cette équipe avait cocultivé des MDDCs différenciés à partir de précurseurs CD34+ avec des lignées immortalisées par HTLV-1. Elle a noté "une affinité remarquable d'HTLV-1 pour la membrane plasmique des DCs. Cependant, aucune intériorisation virale ou bourgeonnement n'est observé au niveau des DCs et ceci sur plus de 30 expériences (Zucker-Franklin et al., 1995). L'étude de Ceccaldi, en 2006, a exploré l'infection des MDDCs par HTLV-1 en coculture avec des lignées de lymphocytes T chroniquement infectés (MT2 ou C91-PL). Afin de déterminer si les DCs sont permissives à l'infection par HTLV-1, la protéine cytosolique p24 d'HTLV-1 est marquée à 7 heures après contact entre MDDCs et lymphocyte T infectés. La protéine p24 est ensuite marquée à 24 heures, 48 heures et 6 jours après contact DC-lymphocyte T. L'augmentation de fluorescence entre ces différents points a suggéré que les DCs sont susceptibles à l'infection. De plus, cette étude a montré que DC-SIGN est un facteur qui facilite la fusion des DCs avec HTLV-1 (Ceccaldi et al., 2006). Jain a examiné le rôle de DC-SIGN dans le cadre de l'infection productive des lignées B-THP-1 et B-THP-1/DC-SIGN par le virus HTLV-1 libre. Les résultats obtenus montrent que les cellules B-THP-1/DC-SIGN sont plus sensibles à l'infection productive par le virus HTLV-1 libre en comparaison aux cellules n'exprimant pas DC-SIGN. Ces résultats suggèrent donc que DC-SIGN joue non seulement un rôle dans l'augmentation de l'entrée virale mais encore dans l'infection



productive. C'est la raison pour laquelle le blocage de l'expression de DC-SIGN durant une infection pourrait constituer une stratégie thérapeutique efficace. Jain a ensuite confirmé le rôle de DC-SIGN dans le cadre de l'infection des MDDCs par le virus HTLV-1 libre. Ici, l'usage d'un siRNA spécifique contre DC-SIGN inhibe également d'un facteur de 5 l'infection productive des MDDCs par le virus HTLV-1 libre (Jain et al., 2009). De son côté, Jones a montré que le virus HTLV-1 libre pouvait infecter les DCs myéloïdes ou plasmacytoïdes fraîchement isolées mais aussi des MDDCs *ex vivo*. Son étude est intéressante dans la mesure où les virions libres sont généralement faiblement infectieux *in vitro* (Feuer and Green, 2005) mais aussi *in vivo* (Donegan et al., 1994). Jones commence tout d'abord par démontrer que les virions sont internalisés dans les différents sous-types de DCs. Ensuite, afin de mettre en évidence l'infection productive des DCs, Jones a étudié l'expression de la protéine régulatrice Tax au niveau des DCs exposées au virus libre. La protéine Tax n'est pas exprimée dans le virion. Cependant, elle est détectée 48 heures après exposition au virus libre dans la majorité des DCs. L'expression de Tax signe ici l'infection productive des DCs dans la mesure où l'expression de Tax fait suite à l'intégration du provirus dans le génome de la DC et correspond à la production *de novo* des protéines virales. D'ailleurs, le traitement des DCs avec des inhibiteurs de la transcriptase inverse (AZT) ou l'inactivation des virions suffisent à réduire l'expression de Tax de plus de 95%. Selon Jones, Tax est similairement exprimée au niveau des DCs myéloïdes, plasmacytoïdes et les MDDCs (Jones et al., 2008). Si l'étude de Jones suggère ici que les DCs jouent un rôle dans la transmission, la dissémination et la persistance de HTLV-1 *in vivo*, elle met l'accent sur le fait que la transmission d'HTLV-1 aux lymphocytes T implique l'infection *de novo* des DCs (Jones et al., 2008). Cette affirmation contraste ici avec les résultats précédemment décrits pour la transmission de VIH-1 par les DCs matures : les DCs matures ne s'infectent pas productivement par VIH-1 mais transmettent davantage le virus aux lymphocytes T en comparaison à la transmission à partir des DCs immatures (Dong et al., 2007), (Wang et al., 2007), (Sanders et al., 2002).

Parmi les études de Ceccaldi, Jain et Jones, seule l'étude de Ceccaldi étudie l'infection productive des MDDCs à travers une coculture des MDDCs avec des lignées de lymphocytes T chroniquement infectés (MT2 ou C91-PL). Au contraire, les études de Jain et de Jones utilisent du virus libre pour infecter les MDDCs. Dans ce contexte, notre équipe a testé si les MDDCs sont également susceptibles à l'infection par du biofilm viral. Ici, le biofilm viral correspond à un

agrégat infectieux concentré situé à la surface des cellules productivement infectées. Le biofilm offre une protection physique des particules virales et permet leur transfert rapide même lors d'un contact éphémère. D'ailleurs, le biofilm participe efficacement à la transmission virale : *in vitro*, son décrochage mécanique réduit le nombre de cellules infectées de plus de 80% lors de la formation de conjugués cellule-cellule (Pais-Correia et al., 2010). Pour cela, notre équipe a étudié, à travers des expériences de PCR quantitative, l'infection des IL-4 DCs à trois jours de leur culture avec trois sources différentes d'HTLV-1 : le biofilm viral, le virus concentré et le virus libre (Alais et al., 2015). Parmi ces trois sources de virus, c'est l'infection par le biofilm viral qui conduit aux taux les plus importants d'infection des IL-4 DCs. Néanmoins, au contraire des résultats des études de Jain et de Jones, la culture des IL-4 DCs avec du virus libre concentré a conduit à une faible infection des MDDCs. Une explication qui pourrait expliquer la différence des résultats obtenus entre notre équipe et celles de Jain et de Jones quant à l'infection par du virus libre se trouve dans le protocole expérimental. Jain et Jones utilisent des préparations virales qui sont respectivement 30 et 20 fois plus concentrées que celles que notre équipe a utilisé. De plus, au contraire du VIH-1 qui infecterait d'un facteur 10 à 100 fois les lymphocytes T CD4+ en plus que les DCs (McIlroy et al., 1995), la susceptibilité à l'infection est opposée dans le cadre de l'infection par HTLV-1 : Alais a étudié la susceptibilité relative des MDDCs en comparaison à celle des lymphocytes T à la suite de l'exposition de ces deux types cellulaires à différentes sources virale (virus libre, virus concentré et biofilm viral). Les expériences effectuées sur de larges séries de cellules primaires lui ont permis de conclure que les MDDCs ont une charge provirale plus élevée que celle des lymphocytes autologues exposés à du biofilm viral (Alais et al., 2015). De part leurs fonctions immunitaires, les DCs constitueraient ainsi les premières cellules à reconnaître et à interagir avec HTLV-1 lors de la primo-infection. De plus, comme les DCs sont plus susceptibles que les lymphocytes T à l'infection productive par HTLV-1 et comme les DCs peuvent transmettre HTLV-1 aux lymphocytes T, l'étude d'Alais pourrait suggérer que les DCs seraient les premières cellules à s'infecter par HTLV-1 et que ce seraient elles qui transmettent HTLV-1, dans un second temps, aux lymphocytes T. Enfin, il est intéressant de noter que ni les études de Ceccaldi, Jones, Jain et d'Alais n'explorent l'influence des agents lysosomotropes au cours de l'infection productive des DCs par HTLV-1.

## 2 Problématique

L'interaction entre HTLV-1 et les DCs myéloïdes ou les MDSCs immatures donne lieu à une infection productive (Ceccaldi et al., 2006), (Jain et al., 2009) et (Jones et al., 2008). De plus, les expériences d'Alais (Alais et al., 2015) montrent bien que les DCs immatures sont plus susceptibles à l'infection productive que les lymphocytes T ce qui pourrait suggérer l'importance de l'infection productive des DCs dans la transmission virale aux lymphocytes T. D'ailleurs Jones avait aussi montré que le traitement des DCs par l'AZT inhibait à la fois leur infection productive mais aussi le transfert d'HTLV-1 aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Jones et al., 2008). Les résultats de Jones constituent un argument supplémentaire en faveur de l'idée selon laquelle la transmission d'HTLV-1 des DCs aux lymphocytes T suggère une synthèse *de novo* de virus par les DCs (Jones et al., 2008). Ensuite, les expériences de Ceccaldi indiquent qu'HTLV-1 serait internalisé par endocytose et se retrouve au niveau des DCs immatures dans des compartiments dont il n'explore pas la nature (Ceccaldi et al., 2006). Par référence aux compartiments non conventionnels où se retrouvent d'autres virus qui infectent productivement les DCs (VIH-1 (Garcia et al., 2005), vaccine (Sandgren et al., 2010)), nous pourrions suggérer que ces compartiments seraient non conventionnels. Par ailleurs, les pDCs et les MDSCs qui ont servi d'outils pour les expériences de Ceccaldi, Jain et Jones sont loin de représenter la grande diversité des sous-types de DCs. Par exemple, les DCs myéloïdes et les pDCs qui sont des DCs du sang qui reconnaissent HTLV-1 lors de son entrée lors d'une transmission sanguine ne représentent pas les sous-types majoritaires de DCs que rencontrerait HTLV-1 lors de son entrée à la suite d'une transmission digestive ou sexuelle. En effet, au niveau du tube digestif ou lors d'une transmission sexuelle ce sont respectivement les DCs tolérogènes et les DCs inflammatoires qui seraient les premières à interagir avec HTLV-1. D'ailleurs, Kayama a récemment montré que le tube digestif renferme les DCs CD14<sup>+</sup> CD163<sup>faible</sup> et les DCs CD14<sup>+</sup> CD163<sup>élevé</sup> CD160<sup>élevé</sup> dont la fonction est d'induire les lymphocytes Th17 ce qui contribue à la tolérance immune (Kayama and Takeda, 2016). De même, comme lors de la transmission sexuelle du VIH-1, les cellules de Langerhans pourraient être les premières cibles d'HTLV-1 (Kawamura, 2011). A travers de multiples exemples cités dans l'introduction, nous avons vu qu'HTLV-1 détourne les fonctions des DCs : les DCs infectées ne mûrissent pas (Mostoller et al., 2004), ne produisent plus d'IFN (Hishizawa et al., 2004) et

n'induisent pas la prolifération des lymphocytes T (Makino et al., 2000). Si ces exemples illustrent ici le comportement de DCs immatures qui sont susceptibles à l'infection productive par HTLV-1, ils pourraient néanmoins ne pas représenter le comportement de sous-types de DCs qui restreindraient l'infection par HTLV-1. De même, ces exemples ne permettent pas de prévoir, par exemple, le comportement des DCs inflammatoires qui sont des DCs matures et productrices d'IFN lorsqu'elles reconnaissent HTLV-1 à la suite de son entrée au niveau d'une muqueuse enflammée. En partant de ces observations nous nous sommes demandé si les DCs tolérogènes et les DCs inflammatoires avec lesquelles interagirait HTLV-1 à la suite de son entrée par voie digestive ou sexuelle étaient susceptibles, au même titre que les DCs myéloïdes que miment les IL-4 DCs à l'infection par HTLV-1. Nous nous sommes demandé si ces DCs tolérogènes et ces DCs inflammatoires transmettaient similairement HTLV-1 aux lymphocytes T. Pour répondre à ces questions, nous avons différencié à partir des monocytes trois sous-types de DCs en présence de cocktails différents de cytokines :

- Les IL-4 DCs qui sont des MDSCs immatures et qui miment les DCs myéloïdes sont différenciées en présence de l'IL-4 et du GM-CSF.
- Les TGF- $\beta$  DCs qui miment les DCs tolérogènes du tube digestif mais aussi des muqueuses sont différenciées en présence du TGF- $\beta$ , de l'IL-4 et du GM-CSF.
- Les IFN- $\alpha$  DCs qui miment les DCs inflammatoires sont différenciées en présence d'IFN- $\alpha$  et de GM-CSF.
- Enfin, et afin de mieux cerner l'influence de la maturation sur l'infection productive des DCs mais aussi sur la transmission virale aux lymphocytes T, nous avons aussi fait maturer des IL-4 DCs en présence du LPS, l'agoniste du TLR4 pour produire des IL-4 DCs matures.

A travers la coculture de ces sous-types avec des cellules C91-PL, lignée lymphocytaire immortalisée productrice d'HTLV-1, nous avons étudié :

- Les différences de susceptibilité lors d'un contact cellule-cellule entre les sous-types de DCs différenciés et les cellules C91-PL.
- L'influence des agents lysosomotropes sur le devenir de l'infection productive des DCs en culture avec les cellules C91-PL.
- L'effet de l'IFN- $\alpha$  sur l'induction d'une susceptibilité ou d'une résistance à l'infection productive par HTLV-1 au niveau des DCs immatures en culture avec les cellules C91-PL.

- Les mécanismes d'internalisation d'HTLV-1 ainsi que la nature des compartiments qui renferment HTLV-1 dans chacun des sous-types de DCs après culture avec les cellules C91-PL.
- La transmission d'HTLV-1 à partir de chacun de ces sous-types aux lymphocytes T qui représentent la population majoritairement infectée chez les individus infectés par HTLV-1.

### 3 Article

#### Contexte de l'article :

En partant des trois sous-types de MDDCs : les IL-4DCs (qui miment les DCs myéloïdes), les TGF- $\beta$  DCs (qui miment les DCs tolérogènes) et les IFN- $\alpha$  DCs (qui miment les DCs inflammatoires) ainsi que des IL-4 DCs maturés au LPS, nous avons répondu aux questions suivantes :

- Existe-t-il des différences de susceptibilité entre les sous-types de MDDCs ?

Nous avons cocultivé chacun des trois sous-types de MDDCs avec une lignée cellulaire chroniquement infectée par HTLV-1 ( les cellules C91-PL). Afin de démontrer si les MDDCs sont susceptibles ou pas à l'infection productive, nous avons ensuite suivi par cytométrie de flux, le pourcentage des MDDCs qui accumulent la protéine de la matrice d'HTLV-1 Gag<sup>p19</sup> sur une cinétique de trois jours. Nous avons confirmé le précédent résultat par PCR quantitative en mesurant pour chaque sous-type de MDDCs cultivé avec du biofilm viral l'évolution du ratio *tax/actine* entre le troisième et le cinquième jour de culture. Nous avons enfin validé les résultats précédents à travers la détection de l'expression de Tax par cytométrie de flux, 72 heures après la coculture des différents sous-types de MDDCs avec les cellules C91-PL en présence ou pas de l'AZT.

Nous avons montré que les IL-4 DCs immatures sont plus susceptibles que les TGF- $\beta$  DCs à l'infection productive. Enfin, les IFN- $\alpha$  DCs et les IL-4 DCs maturés au LPS constituent deux sous-types de MDDCs qui restreignent l'infection productive en comparaison aux IL-4 DCs.

- Est-ce-que l'IFN de type I restreint l'infection productive des MDDCs ?

Les IFN- $\alpha$  DCs et les IL-4 DCs maturés au LPS produisent de l'IFN de type 1. Pour cela, on s'est demandé si c'est l'IFN de type 1 qui restreint leur infection par HTLV-1. Pour répondre à cette question, nous avons traité des IL-4 DCs avec l'IFN- $\alpha$ 2a ou avec le surnageant de culture des IFN- $\alpha$  DCs ou avec le surnageant de culture des IL-4 DCs maturées au LPS. Nous avons ensuite cocultivé ces IL-4 DCs différemment traitées avec les cellules chroniquement infectées C91-PL et nous avons enfin étudié, par cytométrie de flux, l'expression de Tax au niveau des MDDCs après trois jours de coculture.

Nous avons constaté que les traitements des IL-4 DCs immatures par l'IFN- $\alpha$ 2a ou par les surnageants de culture des IFN- $\alpha$  DCs ou par les surnageants de culture des IL-4 DCs maturées au LPS ne restreignent pas l'infection productive par HTLV-1.

- Est-ce-que le trafic d'HTLV-1 dans les trois sous-types de MDDCs permet d'expliquer la restriction de l'infection productive ?

A travers des expériences de cytométrie de flux, nous avons testé l'influence des inhibiteurs de la macropinocytose, de l'endocytose via les puits à clathrine, de l'actine, des microtubules, des récepteurs tyrosine kinase, des PI3K, des PKCs, de PAK et de Rac1 sur la capture de HTLV-1 par les IL-4 DCs, par les IL-4 DCs maturés au LPS et par les IFN- $\alpha$  DCs. Nous avons montré qu'HTLV-1 est internalisé par macropinocytose et par endocytose via les puits de clathrine au niveau des IL-4 DCs et des IL-4 DCs maturés au LPS. Néanmoins, HTLV-1 est internalisé par endocytose via les puits de clathrine au niveau des IFN- $\alpha$  DCs.

Nous avons ensuite étudié, à travers des expériences de microscopie confocale, la colocalisation d'HTLV-1 avec les marqueur EEA1 (marqueur des endosomes précoces) ou CD82 (marqueurs des tétraspanines) au niveau des trois sous-types de MDDCs. Nous avons ici observé qu'HTLV-1 ne colocalise pas avec le marqueur EEA1 au niveau des trois sous-types de DCs. Néanmoins, HTLV-1 colocalise totalement avec le marqueur CD82 au niveau des 3 sous-types de DCs. Ces résultats suggèrent qu'HTLV-1 se retrouverait dans un compartiment non conventionnel.

Par la suite, nous avons montré, à travers des expériences d'imagerie, que les endosomes des IL-4 DCs sont neutres. Au contraire, les endosomes des IL-4 DCs maturés au LPS et des IFN- $\alpha$  DCs sont acides. Pour cela, nous avons émis l'hypothèse que le trafic d'HTLV-1 dans les compartiments acides des IL-4 DCs maturés au LPS et des IFN- $\alpha$  DCs serait responsable de la restriction de l'infection par HTLV-1. Pour valider cette hypothèse, nous avons testé l'influence de l'acidité des compartiments sur le devenir de l'infection productive : nous avons pré-traité les IL-4 DCs maturés au LPS et les IFN- $\alpha$  DCs par la chloroquine (un agent lysosomotrope qui neutralise le pH des vésicules acides) et nous les avons cocultivés avec les cellules C91-PL pendant trois jours. Les résultats de la détection de Tax, par cytométrie de flux, montrent que la neutralisation de l'acidité des vésicules des IFN- $\alpha$  DCs et de celles des IL-4 DCs maturés au LPS restaure partiellement, l'infection productive.

- Est-ce-que les trois sous-types de MDDCs transmettent similairement HTLV-1 aux lymphocytes T ?

Nous avons, enfin, testé la capacité des trois sous-types de MDDCs à transmettre HTLV-1 aux lymphocytes T. Pour cela, nous avons, dans un premier temps, cocultivé les IL-4 DCs, les IL-4 DCs maturés au LPS et les IFN- $\alpha$  DCs avec les cellules C91-PL avant de procéder à une purification des MDDCs. Ici, la purification des MDDCs s'est faite à travers leur séparation magnétique par sélection positive à partir de la coculture. Ces DCs purifiées sont ensuite cocultivées avec les cellules reportrices Jurkat-LTR-luc pendant deux jours supplémentaires. Au bout de ces deux jours, le signal luciférase correspond à la transmission d'HTLV-1 à partir des DCs en l'absence d'infection productive (trans-infection). Similairement, des DCs purifiées sont laissées en culture pendant trois jours avant d'être cocultivés sur deux jours supplémentaires avec des Jurkat LTR-Luc. Dans ce cas, le signal luciférase reflète la capacité des DCs à transmettre un virus produit *de novo* (cis-infection).

Ici, les résultats obtenus, sur ces deux expériences, révèlent que les IL-4 DCs transmettent davantage HTLV-1 aux lymphocytes T, en comparaison aux IL-4 DCs maturés au LPS et aux IFN- $\alpha$  DCs.

L'article figurant ci-dessous a été soumis à la revue Plos Pathogens le 22 décembre 2016. Il a été accepté le 13 avril 2017 et publié, en ligne, le 20 avril 2017.



**Dendritic Cell Maturation, but not Type I Interferon Exposure, Restricts Infection by HTLV-1, and Viral Transmission to T-Cells.**

**Running title: Susceptibility of dendritic cell subsets to HTLV-1 infection**

Gergès Rizkallah<sup>1,2</sup>, Sandrine Alais<sup>1,2</sup>, Nicolas Futsch<sup>1,2</sup>, Yuetsu Tanaka<sup>3</sup>, Chloé Journo<sup>1,2</sup>, Renaud Mahieux<sup>1,2</sup>, and Hélène Dutartre<sup>1,2\*</sup>.

1: International Center for Research in Infectiology, Retroviral Oncogenesis laboratory, INSERM U1111 – Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon, F-69007, Lyon, France

2: Equipe labellisée “Ligue Nationale Contre le Cancer”

3: Department of Immunology, Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus, Uehara 207, Nishihara-cho, Okinawa 903-0125, Japan

\*Corresponding author: [helene.dutartre@ens-lyon.fr](mailto:helene.dutartre@ens-lyon.fr)

## Abstract

Human T lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1) is the etiological agent of Adult T cell Leukemia/Lymphoma (ATLL) and HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). Both CD4<sup>+</sup> T-cells and dendritic cells (DCs) infected with HTLV-1 are found in peripheral blood from HTLV-1 carriers. We previously demonstrated that monocyte-derived IL-4 DCs are more susceptible to HTLV-1 infection than autologous primary T-cells, suggesting that DC infection precedes T-cell infection. However, during blood transmission, breast-feeding or sexual transmission, HTLV-1 may encounter different DC subsets present in the blood, the intestinal or genital mucosa respectively. These different contacts may impact HTLV-1 ability to infect DCs and its subsequent transfer to T-cells. Using *in vitro* monocyte-derived IL-4 DCs, TGF- $\beta$  DCs and IFN- $\alpha$  DCs that mimic DCs contacting HTLV-1 *in vivo*, we show here that despite their increased ability to capture HTLV-1 virions, IFN- $\alpha$  DCs restrict HTLV-1 productive infection. Surprisingly, we then demonstrate that it is not due to the antiviral activity of type-I interferon produced by IFN- $\alpha$  DCs, but that it is likely to be linked to a distinct trafficking route of HTLV-1 in IL-4 DCs vs. IFN- $\alpha$  DCs. Finally, we demonstrate that, in contrast to IL-4 DCs, IFN- $\alpha$  DCs are impaired in their capacity to transfer HTLV-1 to CD4 T-cells, both after viral capture and trans-infection and after their productive infection. In conclusion, the nature of the DCs encountered by HTLV-1 upon primo-infection and the viral trafficking route through the vesicular pathway of these cells determine the efficiency of viral transmission to T-cells, which may condition the fate of infection.

## Author Summary

Human T-LymphotropicVirus type 1 (HTLV-1) is the etiological agent of Adult T-cell Leukemia/Lymphoma (ATLL) and HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). In chronically infected patients, the provirus is mainly detected in the CD4 T-cell population. However, beside lymphocytes, HTLV-1 infects blood- or monocyte-derived dendritic cells (DCs) *in vitro*. Moreover, we previously showed that DCs are more susceptible to HTLV-1 infection than autologous T-cells, suggesting that DCs might be the first cells to be infected upon primo-infection, and important intermediaries for the viral spread to surrounding lymphocytes. Interestingly, different DC subsets are found in the blood or in the mucosa, the two entry routes used by HTLV-1 during infection of new individuals. In this study, we show for the first time that the different DC subsets are not equally susceptible to HTLV-1 infection. Furthermore we demonstrate that DC subsets with an increased ability to capture HTLV-1 virion are restricted to HTLV-1 productive infection. This restriction is linked to DC maturation but not to the antiviral activity of IFN- $\alpha$  produced by resistant DCs. Finally, we demonstrate that efficient viral transmission to T-cells is dependent upon DC productive infection rather than trans-infection. Altogether, our results indicate that the nature of the DCs encountered by HTLV-1 upon primo-infection determines the efficiency of viral transmission to T-cells, which may condition the fate of infection.

## Introduction

Human T-Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1) infects 5-10 million people [1]. HTLV-1 is mainly present in Japan, inter-tropical Africa, the Caribbean and South America [2,3]. After a long period of clinical latency, HTLV-1 infection leads, in a fraction of infected individuals, either to Adult T-cell Leukemia/Lymphoma (ATLL) [4], an uncontrolled CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation of very poor prognosis, or to an inflammatory disorder named HTLV-1 Associated Myelopathy / Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) [5]. *In vivo*, in chronically infected individuals, HTLV-1 is mainly found in CD4<sup>+</sup> T-cells, but infected dendritic cells (DCs) are also detected *in vitro* and more importantly *in vivo* [6,7,8,9,10,11]. Their function is subsequently altered *in vivo* [11,12,13] and these cells are therefore likely to be involved in viral pathogenesis.

The role of DC infection in HTLV-1 dissemination to T-cells has been investigated in mice exposed to chimeric HTLV-1-infected cells, in which the HTLV-1 envelope had been replaced by that of the Moloney murine leukemia virus, to allow HTLV-1 to enter murine cells. In this context, DC depletion leads to a decreased proviral load in mouse CD4<sup>+</sup> T-cells [14]. In addition, HTLV-1 viruses harboring mutations in the p12 and p30 regulatory genes that have lost their ability to infect human DCs, also have an impaired ability to infect macaques [15]. Altogether, these *in vivo* experiments strongly suggest that infection of DCs is required for the establishment and maintenance of HTLV-1 infection in animal models. Consistent with these data, we recently showed that human monocytes-derived dendritic cells (MDDCs) are more susceptible to HTLV-1 infection than autologous lymphocytes *in vitro* [9], supporting a model where DC infection represents an important step upon primo-infection *in vivo*.

In addition to the blood, DCs are widely distributed in peripheral tissues and in mucosae, where antigen capture might occur. DCs play a central role in activating naïve T-cells and directing the

subsequent immune response. DCs are constituted of several distinct subsets that differ in their ability to activate immunity or to promote tolerance [16]. Since HTLV-1 is transmitted through contact with infected cells present in maternal milk, semen or blood, viruses may first be in contact with different DC subsets present in these different tissues. The interaction of HTLV-1-infected cells with a given DC subset may thus affect the subsequent immune response. In addition, interaction with distinct DC subsets might have an impact on the risk of developing ATLL in the case of mother-to-child transmission or on the risk of developing HAM/TSP in the case of infection with contaminated blood [17,18].

We therefore investigated whether different MDDC subsets that are similar to tissue-resident DCs exposed to HTLV-1 during primary infection in humans are equally susceptible to HTLV-1 infection. Human MDDCs were generated with cytokines that allow differentiation into different subsets: interleukin-4 (IL-4) for myeloid DCs of the blood, transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) for mucosal DCs of the gut and interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) for inflammatory DCs found in injured skin [19]. We demonstrate that IL-4 DCs and to a lesser extent TGF- $\beta$  DCs are susceptible to HTLV-1 infection, while IFN- $\alpha$  DCs are not. We then demonstrate that IFN- $\alpha$  DC resistance to HTLV-1 infection is not due to IFN- $\alpha$  production. In contrast, we demonstrate that DC maturation, in addition to viral trafficking through acidic vesicles, contributes to DC resistance to HTLV-1 infection. Finally, we show that HTLV-1 productive infection of immature DCs, rather than viral capture by matured-DCs, is required for HTLV-1 transmission from DCs to T-cells. These results demonstrate for the first time that immature DCs represent the main DC population that allows infection of T-cells.

## Material and methods

### Reagents and antibodies

Chlorpromazine (20 $\mu$ M, resuspended in H<sub>2</sub>O), diphenyl iodonium chloride (10  $\mu$ M, resuspended in DMSO); dynasore (100 $\mu$ M, resuspended in DMSO), methyl- $\beta$ -cyclodextrin (10mM, resuspended in H<sub>2</sub>O), nystatin (270 $\mu$ M, resuspended in DMSO), amiloride (375 $\mu$ M, resuspended in H<sub>2</sub>O), latrunculin (2 $\mu$ M, resuspended in DMSO), cytochalasin D (2 $\mu$ M, resuspended in DMSO), genistein (200 $\mu$ M, resuspended in MeOH), wortmanin (40 $\mu$ M, resuspended in DMSO), rottlerin (25 $\mu$ M, resuspended in EtOH), Gö6953 (1 $\mu$ M, resuspended in DMSO), NSC23766 trihydrochloride (250 $\mu$ M, resuspended in H<sub>2</sub>O) and IPA-3 (125 $\mu$ M, resuspended in DMSO) were purchased from Sigma.

Toll like receptor (TLR)-2 agonist (PAM3CSK4; 1  $\mu$ g/ml); TLR-5 agonist (Flagellin; 200 ng/ml); TLR-3 agonist (Poly(I:C); 10  $\mu$ g/ml); TLR-4 agonist (LPS; 1 $\mu$ g/ml); TLR-7/8 agonist (R848; 3 $\mu$ g/ml) were purchased from Invivogen. Recombinant IFN- $\alpha$  (500-2000 IU/ml) was purchased from Tebu-Bio.

The following antibodies were purchased from BD Biosciences: APC-H7-labeled mouse anti-Human CD14 (M $\phi$ P9); V450-coupled mouse anti-Human CD11c (clone Ly6); PE-Cy7-coupled mouse anti-Human CD40 (clone 5C3); PerCPCy5.5-coupled mouse anti-Human HLA-DR (clone G46.6). APC-coupled mouse anti-Human DC-SIGN (DCN47.5) and Vio-Bright-FITC-coupled mouse anti-Human BDCA4 (clone AD517F6) were from Miltenyi. PE-coupled mouse anti-Human CD86 (clone IT2.2) was from Ebioscience. Mouse anti-HTLV-1 Gag p19 antibody (clone TP7) was from Zeptometrik, and biotin-coupled mouse anti-HTLV-1 Tax antibody (clone LT4, [20]) was provided by Pr Tanaka.

## **Cells**

Jurkat cells stably transfected with a plasmid encoding the luciferase (Luc) gene under the control of the HTLV-1 long terminal repeat (LTR) promoter (Jurkat-LTR-Luc) [21] were maintained under hygromycin (450 µg/ml, Sigma) selection in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Gibco Life Technologies) and penicillin-streptomycin (100 µg/ml; Gibco Life Technologies). HTLV-1 infected T-cells (C91-PL) were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS and penicillin-streptomycin (100 µg/ml). The human fibrosarcoma cell line containing a plasmid encoding the luciferase gene under the control of the immediate early IFN inducible 6-16 promoter (HL116) [22] were maintained under HAT selection in DMEM medium supplemented with 10% FCS and penicillin-streptomycin (100 µg/ml). Monocyte-derived dendritic cells were maintained in complete MDDC medium composed of RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 100 µg/ml of penicillin-streptomycin, non-essential amino acids (2.5 mM; Gibco Life Technologies), sodium pyruvate (1 mM; Sigma), β-mercaptoethanol (0.05 mM; Gibco Life Technologies), and HEPES (10 mM; Gibco Life Technologies). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF; 100 ng/ml; Miltenyi) and interleukine 4 (IL-4, 100 ng/ml; Miltenyi), or transforming growth factor beta (TGF-β, 10 ng/ml, Eurobio), or interferon alpha (IFN-α, 500 IU/ml, Tebu-bio) were added to the medium for differentiation. All cells were grown at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.

### **Human primary monocyte-derived dendritic cells (MDDCs)**

Blood was collected by Etablissement Français du Sang (Lyon, France) from non-infected blood donors. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinized blood on Ficoll density gradient. Monocytes were purified from PBMCs on Percoll gradients. Cells were cryopreserved in 10% dimethylsulfoxide (DMSO) - 50% FCS - 40% culture medium before being

used. Dendritic cells were generated after culture of monocytes in complete MDDC medium. IL-4 DCs were obtained after culture of monocytes in complete MDDC medium supplemented with GM-CSF and IL-4 for 5 days. Fresh cytokines were added 72 h later. When indicated, IL-4 DCs were further treated for 18 h by the addition of TLR agonists or recombinant IFN- $\alpha$  in the MDDC medium. TGF- $\beta$  DCs were obtained after culture of monocytes in complete MDDC medium supplemented with GM-CSF, IL-4 and TGF- $\beta$  for 5 days. Fresh cytokines were added 72 h later. IFN- $\alpha$  DCs were obtained from monocytes cultured in complete MDDC medium supplemented with GM-CSF and IFN- $\alpha$  for 3 days. Fresh cytokines were added 24 h later.

### **MDDC infection**

MDDCs ( $2.5 \times 10^5$  cells) were co-cultured with C91-PL cells ( $2.5 \times 10^4$  cells), pre-treated with mitomycin C (50 $\mu$ g/ml, Sigma). MDDCs were then collected after 3h or 72h of co-culture, fixed and used for flow cytometry analyses (FACS Canto II; BD Biosciences) and imaging. When indicated, MDDCs were infected in presence of azido-thymidine (AZT, 10  $\mu$ g/ml, Sigma) or treated with chloroquine (150  $\mu$ M, Sigma) or diphenyl iodonium chloride (10  $\mu$ M, Sigma) before co-culture with mitomycin-treated C91-PL cells.

When indicated, MDDCs ( $2.5 \times 10^5$  cells) were infected by biofilm preparation (100  $\mu$ l) purified as previously described [9]. At each time point, MDDCs were collected, washed several times with PBS and stored as pellets before genomic DNA extraction and real-time PCR analysis. When indicated, biofilm was heat-inactivated at 56°C before contact with MDDCs.

### **HTLV-1 capture assay**

MDDCs ( $2.5 \times 10^5$  cells) were plated in 48-well plates and treated with drugs targeting several endocytosis pathways for 3 h. Untreated cells were incubated in the same conditions and were used as controls. Treated and control MDDCs were then co-cultured with mitomycin-treated C91-PL



cells ( $2.5 \times 10^4$  cells) for an additional 3 h. Cells were then fixed and stained for flow cytometry analyses.

### **Immunofluorescence and confocal microscopy.**

MDDCs ( $150 \times 10^3$  cells per well) were plated in Lab-Tek chamber slides (Nunc) previously treated with Poly-L-lysine (Sigma, P4832) according to the manufacturer's instructions and cultured for 18 h. When needed, LPS ( $1\mu\text{g/ml}$ ) was added. MDDCs were then co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells (ratio 10:1) for 3h and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA). Cells were extensively washed with PBS, quenched with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution (50mM) and permeabilized with PBS - 1% BSA - 0.1% saponin. Cells were then stained using a serum from an HTLV-1 infected patient (PH 1596, with an agreement from the Comité de protection des personnes Ile de France, [CPP-IDF-2012-10-04SC] gift from Dr Gessain, Institut Pasteur) followed by a DyLight 488-labeled Goat anti-Human IgG Antibody (1/1000; Vector laboratories) and anti-CD82 antibody (AM26701PU-N, Acris) followed by a DyLight 549-labeled anti-Mouse IgG Antibody (1/1000; Vector laboratories). When indicated, cells were stained with anti p19<sup>Gag</sup> antibody followed by a DyLigh 549-labelled anti-mouse antibody and anti-human EE1A antibody (N19, Santa-Cruz biotechnology) followed by a FITC-labelled anti-goat antibody (Dako). After washes in PBS and lastly in water, slides were mounted in Dapi-Fluoromount G (Southern Biotech). Samples were examined under a Leica spectral SP5 confocal microscope equipped with a 63x 1.4-0.6 oil-immersion objective using the LAS-AF software, or using a Zeiss LSM800 confocal microscope equipped with a 63x 1.4 oil immersion objective on the ZEN software. Images were analyzed using ImageJ.

### **Determination of the pH of vesicles and quantification of lipid droplets**

MDDCs were plated in Lab-Tek wells and incubated with the lysotracker Red DND-99 (5 $\mu$ M, Thermofisher scientific, L7528) for 30 minutes. Cells were then extensively washed and fixed in 4% PFA. For lipid droplets staining, cells were fixed in 4% PFA, and stained with Nile Red (0,25 mg/ml; Sigma) for 15 min. After several washes in PBS and lastly in water, slides were mounted in Dapi-Fluoromount G and fluorescence analyzed with routine inverted microscope Zeiss axiovert 135 microscope. Fluorescent signals were quantified with ImageJ.

### **Flow cytometry**

MDDCs (2.5 x 10<sup>5</sup> cells) were collected, washed in PBS and stained with the following panel: APC-H7-labeled mouse anti-Human CD14; V450-coupled mouse anti-Human CD11c; PE-Cy7-coupled mouse anti-Human CD40; PerCPCy5.5-coupled mouse anti-Human HLA-DR, APC-coupled mouse anti-Human DC-SIGN, Vio-Bright-FITC-coupled mouse anti-Human BDCA4 and PE-coupled mouse anti-Human CD86. To analyze HTLV-1 capture, MDDCs were collected after co-culture with mitomycin-treated C91-PL cells, washed in PBS and fixed with 4% PFA. Cells were permeabilized with PBS - 1% BSA - 0.1% saponin, and stained with a mouse anti-p19<sup>gag</sup> antibody (1:1000) followed by a DyLight 488-coupled goat anti-mouse antibody (1:1000). Cells were then washed twice with PBS - 1% BSA - 0.1% saponin and once with PBS - 1% BSA and finally stained with V450-coupled anti-human CD11c antibody.

To analyze productive infection, MDDCs were collected after co-culture with C91-PL, washed in PBS and in normal goat serum (7%, Sigma), fixed and permeabilized according to the manufacturer's instructions (eBiosciences). Cells were stained with biotin-coupled anti-Tax antibody (LT4) followed by streptavidin labeled with PE-Cy7 (BioLegend, Ozyme). After extensive washes, cells were finally surface-stained with a V450-coupled anti-CD11c antibody.

All results were acquired by flow cytometry using at least 50 000 events (FACSCantoII; BD-Biosciences) and analyzed with FlowJo single cell analysis software.

### **Genomic DNA extraction and real-time PCR**

Genomic DNA was extracted using the Nucleospin blood kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA concentration was determined with a NanoDropND1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed on 10 ng of genomic DNA as previously described [9].

### **RNA extraction and RT-PCR.**

IL-4 DCs ( $2.5 \times 10^5$  cells) were plated in 48-well plates and treated with 500 IU/ml of recombinant IFN- $\alpha$  for 18h. Cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and total RNA was extracted using the RNeasy minikit (Quiagen, 74106). Extracted RNA was treated with RQ1-RNase-free DNase (Promega). RNA concentration was determined with a NanoDropND1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). RT-PCR was performed on 500 ng of RNA using the SuperScript Reverse Transcriptase (ThermoFisher). cDNA concentration was then determined with a NanoDropND1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). cDNA amplification was performed on 200 ng of cDNA using the GoTaq polymerase (Promega) and Mx1 primers as previously described [23]. PCR products were analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel.

### **Viral transfer to T-cells**

To determine the ability of MDDCs to transfer HTLV-1 without being infected, MDDCs ( $3 \times 10^6$  cells) were exposed to mitomycin-treated C91-PL cells ( $2 \times 10^5$  cells) for 4 h in 6-well plates. Then, DCs were magnetically isolated using the CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) Microbead kit (Miltenyi Biotec, 130-090-532). Isolated DCs ( $10^5$  cells) were co-cultured with Jurkat-LTR-Luc ( $10^5$  cells) in 48-well plates. Co-culture was performed for 48 h. Cells were then collected, and

luciferase reporter activity assayed (Luciferase kit Promega). Results were normalized according to the amount of proteins determined by Bradford (Biorad).

To determine the ability of productively infected MDDCs to transfer the virus to T-cells, MDDCs ( $3 \times 10^6$  cells) were exposed to mitomycin-treated C91-PL cells ( $2 \times 10^5$  cells) for 4 h in 6-well plates. Then, DCs were magnetically isolated using the CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) Microbead kit. Isolated DCs ( $1 \times 10^5$  cells) were cultured in 48-well plates for 72 hours in the presence or absence of 100  $\mu$ M of AZT added in culture medium each day. Jurkat-LTR-Luc cells ( $10^5$  cells) were then added and the co-culture was maintained for 48 h. Cells were then collected, and luciferase reporter activity assayed. Results were normalized according to the amount of proteins determined by Bradford (Biorad).

#### **Quantification of cell-cell contacts**

Jurkat LTR-Luc cells were transduced with Lenti-IRES-GFP as previously described [24]. C91-PL cells were stained with 20 nM of cell tracker red CMPTX (Invitrogen C33542) in RPMI 1640 medium for 30 minutes at 37°C, and washed twice with RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS and penicillin-streptomycin (100  $\mu$ g/ml) before use. Mock treated and LPS-treated IL-4 DCs or IFN- $\alpha$  DCs ( $5 \times 10^4$  cells) from the same donor were mixed with transduced Jurkat LTR-Luc cells ( $5 \times 10^4$  cells) and red-labelled C91-PL ( $5 \times 10^3$  cells), plated in Lab-Tek chamber slides previously treated with Poly-L-lysine and cultured for 45 minutes at 37°C. Cells were then fixed with 4 % PFA for 15 minutes at room temperature. After several washes in PBS, slides were mounted in Dapi-Fluoromount G. Signals were acquired with an Axioimager Z1 microscope (Zeiss), and analyzed with ImageJ. Contacts between unstained MDDCs and GFP transduced Jurkat-LTR-Luc cells were manually counted from at least 10 pictures taken from the same slide.

### **Type I interferon quantification**

HL116 cells were seeded at  $2 \times 10^4$  cells/well in 96-U-bottom-well plates and incubated for 24 h. Supernatant collected from MDDCs cultures (100 $\mu$ l) or serial dilutions of recombinant IFN- $\alpha$  used for standard curve determination were added for an additional 17 h. Cells were then lysed and luciferase activity assayed.

### **Statistics and representation of data**

One-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's post-hoc multiple comparison test was used to determine statistically significant differences. Paired two-tail t-test was used to compare two groups from the same donor. Differences were considered significant if the p-value was < 0.05.

## Results

### **Immature IL-4 DCs and tolerogenic TGF- $\beta$ DCs but not IFN- $\alpha$ DCs are susceptible to HTLV-1.**

To determine whether all DC subsets were equally susceptible to HTLV-1, IL-4 DCs, TGF- $\beta$  DCs and IFN- $\alpha$  DCs were generated from human primary monocytes. DC differentiation was controlled by the loss of CD14 expression and the acquisition of CD11c expression (S1A Fig.). Consistent with previous data [19], IL-4 DCs and TGF- $\beta$  DCs displayed the most immature phenotype, with a low surface expression of CD86, CD40 and HLA-DR markers (S1A Fig.). Expression of these maturation markers was increased in IFN- $\alpha$  DCs confirming their more mature phenotype (S1A Fig.). The three different DC subtypes were then exposed to infected C91-PL cells. Infection was first monitored by the accumulation of the structural p19<sup>gag</sup> viral protein over time (Fig. 1A). In IL-4 DCs, the relative abundance of p19<sup>gag</sup>-positive cells significantly increased between 3h and 72 h post infection (p.i.), while it significantly decreased in IFN- $\alpha$  DCs, suggesting that IFN- $\alpha$  DC are not productively infected. Of note, in TGF- $\beta$  DCs, the amount of p19<sup>gag</sup>-positive cells did not change significantly, suggesting a reduced level of infection. To confirm this result, the amount of proviral DNA was quantified 3 and 5 days after contact of the different DCs with purified HTLV-1 viral biofilm (Fig. 1B). Viral biofilm are membrane-bound viruses that are embedded in extracellular matrix-rich structures at the surface of infected cells [21]. Infection with purified viral biofilm allows quantification of viral DNA resulting from *de novo* infection of target cells, without contamination with viral DNA from C91-PL that occurs when infection is performed through co-culture with infected cells. As previously shown [9], proviral DNA was detected in IL-4 DCs exposed to viral biofilm, and its amount significantly increased during the course of infection (Fig. 1B). Proviral DNA was also detected in TGF- $\beta$  DCs exposed to viral biofilm but,

consistent with the low accumulation of viral p19<sup>gag</sup>, its amount did not significantly increase during the course of exposure (Fig. 1B), suggesting that TGF- $\beta$  DCs are less susceptible than IL-4 DCs to HTLV-1 infection. In contrast, HTLV-1 viral DNA was barely detected in IFN- $\alpha$  DCs exposed to viral biofilm and its amount did not change during the course of infection (Fig. 1B). As a control, no viral DNA was detected when heat-inactivated viral biofilm was used (Fig. 1B).

Productive infection was further confirmed by detection of Tax expression, since this viral protein is absent from the viral particle. Consistent with the amount of viral DNA, a higher percentage of IL-4 DCs expressed Tax compared to TGF- $\beta$  DCs, with a mean of 0,6% infected cells (Fig. 1C). A significant reduction in the number of Tax-expressing cells was observed among IL-4 DCs when infection was performed in the presence of AZT (S1B Fig.), confirming that Tax expression results from productive infection. In addition, a very low percentage of Tax-expressing cells were found in the IFN- $\alpha$  DC population (Fig 1C) with a mean of 0,1% infected cells. These results confirm that IL-4 DCs are productively infected, as previously shown [9]. Altogether, these results demonstrate that the IL-4 DC population is more susceptible to HTLV-1 infection than the TGF- $\beta$  one, and that the IFN- $\alpha$  DC population is resistant to HTLV-1 infection.

### **HTLV-1 viral entry is more efficient in DCs that restrict HTLV-1 infection.**

To understand the mechanism leading to differential susceptibility to HTLV-1 infection in the three DC subsets, we first controlled the expression of HTLV-1 (Fig. 2). Two proteins, the binding receptor NRP-1 and the fusion receptor Glut-1, have been involved in HTLV-1 entry in CD4+ T lymphocytes [25]. In addition, DC-SIGN is involved in HTLV-1 binding to DCs [7] and is important for DC infection [6]. NRP-1 was expressed in all DC subsets, although its level was significantly higher in IL-4 and TGF- $\beta$  DCs than in IFN- $\alpha$  DCs (Fig. 2A). Similarly, DC-SIGN was expressed in all DC subsets but its expression was significantly higher in IL-4 DCs (Fig. 2B).

In contrast, Glut-1 expression was similar in all three DC subsets (Fig. 2C). These results suggest that HTLV-1 binding might be lower in IFN- $\alpha$  DC and TGF- $\beta$  compared to IL-4 DC. We therefore measured viral capture using detection of p19<sup>gag</sup> in the DC populations 3h after contact with C91-PL infected cells (Fig. 2D) in addition to productive infection determined 3 days post contact (Fig. 2E). Surprisingly, capture was 6-fold higher in IFN- $\alpha$  DCs and 3 fold higher in TGF- $\beta$  DCs compared to IL-4 DCs (Fig. 2D). This suggests that viral capture is inversely correlated to productive infection (Fig. 2E), and could be independent of NRP-1 and/or DC-SIGN expression level. Thus, IFN- $\alpha$  DC resistance to HTLV-1 infection is not linked to decreased capture efficiency or to a lower expression of viral fusion receptor.

#### **Exposure to type I IFN does not restrict infection of IL-4 DCs.**

It is well established that type I IFN controls several viral infections through the induction of numerous interferon-inducible genes (ISGs) that restrict viral cycle at different levels [26]. Furthermore, HTLV-1 infection is restricted when target T-cells are treated with IFN- $\alpha$  before contact with the virus [23,27]. We therefore measured the basal level of IFN- $\alpha$  production by the three different DC subtypes. As expected, IFN- $\alpha$  DCs produced and released higher levels of type I IFN compared to IL-4 or TGF- $\beta$  DCs (Fig. 3A).

Given that IFN- $\alpha$  production by IFN- $\alpha$  DCs could be responsible for their resistance to HTLV-1 infection, we treated IL-4 DCs with increasing doses of recombinant IFN- $\alpha$  2a before co-cultivating them with C91-PL infected cells. We first verified that recombinant IFN- $\alpha$  treatment did not affect IL-4 DC phenotype (S2A Fig.) and was sufficient to induce expression of ISGs as measured by the up-regulation of *Mx-1* mRNA (Fig. 3B).

Surprisingly however, treatment of IL-4 DCs with recombinant IFN- $\alpha$  did not affect their susceptibility to HTLV-1 as exemplified by the number of CD11c-positive Tax-positive cells



shown for a representative experiment (Fig. 3C) and the percentage of infected DCs observed in different experiments performed with cells from several independent donors (Fig 3D), or by the number of p19<sup>gag</sup>-positive cells after 3h of DCs exposure to C91-PL cells (S2B Fig.). These results suggest that IL-4 DC exposure to IFN- $\alpha$  does not affect their susceptibility to HTLV-1 infection. Type I IFN includes IFN- $\beta$  and 12 different IFN- $\alpha$  proteins that have different antiviral properties. IFN- $\alpha$  2a was recently shown to have the weakest antiviral activity against HIV-1 compared to eight others [28]. Thus, recombinant IFN- $\alpha$  2a used above might not be sufficient for the restriction of HTLV-1 infection in IFN- $\alpha$  DCs. To address this issue, we tested the ability of the physiological type I IFN- $\alpha$  present in the supernatant of IFN- $\alpha$  DCs to restrict HTLV-1 infection in IL-4 DCs. Again, the number of Tax positive IL-4 DCs did not differ significantly when cells were cultured for 18h with or without the supernatant from IFN- $\alpha$  DCs (Fig. 3E-F), confirming that type I IFN produced by IFN- $\alpha$  DCs is not responsible for the resistance of IFN- $\alpha$  DCs to HTLV-1 infection.

#### **Decreased susceptibility to HTLV-1 infection is linked to DC maturation.**

IFN- $\alpha$  DCs are more mature than IL-4 DCs, as shown by the up-regulation of HLA-DR and CD40 markers (S1A Fig. and [19]). We thus asked whether DC maturation could account for restriction of HTLV-1 infection in IFN- $\alpha$  DCs. To test this hypothesis, IL-4 DCs were treated with LPS, a TLR-4 agonist, which induces the up-regulation of DC maturation markers such as HLA-DR, CD40 and CD86 (S3A Fig.). Both immature and LPS-matured IL-4 DCs were then exposed to C91-PL cells for 3 h to measure viral capture, or for 3 days to measure productive infection. Similar to our results with IFN- $\alpha$  DCs, the percentage of p19<sup>gag</sup>-positive DCs was significantly higher in LPS-matured DCs (Fig. 4A), while the percentage of Tax positive DCs was significantly lower when cells had been matured with LPS (Fig. 4B). This indicates that LPS treatment of IL-4 DCs increases HTLV-1 uptake but restricts their productive infection and seems to recapitulate IFN- $\alpha$

DC restriction of HTLV-1. LPS-treatment of IL-4 DCs induced their maturation and was also accompanied with type I IFN production (S4B Fig.). We thus tested whether type I IFN production after LPS-treatment could account for the decreased level of HTLV-1 productive infection. IL-4 DCs were treated with LPS for 3h. Medium was then removed, cells were extensively washed to remove any trace of LPS and cultured for 18h in LPS-free medium. Culture supernatant was then collected and added to another set of the same autologous IL-4 DCs. Addition of this supernatant induced an increase in CD86 expression level although lower to that of fully matured DCs, without any other change in the expression of CD40 or HLA-DR maturation markers (S3A Fig.). Interestingly, treatment of IL-4 DCs with the supernatant from LPS-matured DCs did neither affect DC susceptibility to HTLV-1 as shown using a result from one representative experiment (Fig. 4C) nor the percentage of infected DCs observed in different experiments performed on independent donors (Fig 4D and S3B Fig.), or the number of p19<sup>gag</sup>-positive cells (S3C Fig.). These results suggest that maturation rather than type I IFN production accounts for the decreased susceptibility of LPS-matured DCs to HTLV-1 infection. To confirm this hypothesis, we induced IL-4 DC maturation with different TLR agonist treatments. Stimulation of IL-4 DCs with PolyI:C, R848 or LPS, that are agonists of TLR-3, TLR-7/8 or TLR-4 respectively, induced a fully mature phenotype, as measured by the up-regulation of HLA-DR, CD86 and CD40 (S4A Fig.) and type I IFN production (S4B Fig.). In contrast, stimulation of IL-4 DCs with PAM3 or flagellin that are ligands of TLR-2 or TLR-5 respectively, induced an incomplete mature phenotype (S4A Fig.) with no type I IFN production (S4B Fig.). Interestingly, while treatment with ligands of TLR-3 or TLR-4 significantly increased viral capture (Fig. 4E lanes 4 and 5), treatment with ligands of TLR-3, TLR-7/8 or TLR-4 significantly decreased productive infection (Fig. 4F, lanes 4-6). In contrast, treatment with ligands of TLR-2 or TLR-5 did not affect viral capture (Figure 4E, lanes 2-3) but

led to an increased productive infection of IL-4 DCs (Fig. 4F, lanes 2-3). Altogether, these results suggest that DC maturation independently of type I IFN present in the supernatant of matured DC is responsible for the restriction of HTLV-1 infection in DCs.

### **HTLV-1 is stored in similar vesicles in both permissive and restricted DCs.**

HTLV-1 capture is more important in mature DCs but is not linked to a productive infection. We therefore investigated whether after its capture, HTLV-1 virus might be stored in different compartments according to the different DC subsets. After 3h of contact with infected cells, p19<sup>gag</sup> signal appeared as cytoplasmic punctae in the three DC subsets (Fig. 5A) suggesting a vesicular localization. None of the p19<sup>gag</sup> vesicles were co-stained with the EE1A marker of early endosomes in any DC subset (S5 Fig ). In contrast, most virus-containing vesicles also stained positive for the tetraspanin CD82 marker of multivesicular bodies (MVBs, Fig. 5A, see white arrows), with only 10 % of virus-containing vesicles that did not stain positive for CD82 (Fig. 5A, see green arrows). Interestingly, the same percentage of CD82-positive virus-containing vesicles was observed in the three DC subsets (Fig.5B), suggesting that HTLV-1 might be stored in similar compartments despite a different infection outcome.

### **HTLV-1 uses partially overlapping entry routes in IL-4 and IFN- $\alpha$ DCs.**

To explain the differential susceptibility to HTLV-1 infection, we hypothesized that viral entry mechanisms might differ in IL-4 DCs vs. LPS-matured and IFN- $\alpha$  DCs. Vesicular entry pathways are mediated by several mechanisms of endocytosis that can be blocked by pharmacological inhibitors. Hence, immature IL-4 DCs, LPS-matured IL-4 DCs or IFN- $\alpha$  DCs were treated with inhibitors targeting dynamin-mediated and clathrin-mediated endocytosis (dynasore and chlorpromazine respectively), caveolin-mediated endocytosis (methyl- $\beta$ -cyclodextrin and nystatin), actin polymerization (latrunculin, cytochalasin D) or macropinocytosis (amiloride)

before being co-cultured with C91-PL infected cells. We controlled that treatment with inhibitors did not change the viability of the different DC' subsets compared to untreated DCs (S6A and S6B Fig.). Viral capture was measured after 3h of contact with C91-PL. Treatment with methyl- $\beta$ -cyclodextrin and nystatin, that depleted cholesterol as controlled by the lack of lipids droplets stained by Nile red in IL-4 treated DCs (S6C Fig.), did not affect p19<sup>gag</sup> levels (S6D Fig), suggesting that HTLV-1 entry does not follow caveolin-mediated endocytosis. However, HTLV-1 entry was significantly reduced by both chlorpromazine and latrunculin (Fig. 6A), suggesting a requirement for clathrin-mediated endocytosis and actin polymerization. Interestingly, HTLV-1 entry was significantly reduced by amiloride and dynasore in immature IL4 DCs and LPS-matured DCs but not in IFN- $\alpha$  DCs (Fig. 6A), suggesting the requirement of macropinocytosis specifically in immature and mature IL-4 DCs. Macropinocytosis involves PI3K and PKC that control actin polymerization through the activation of Rac 1 GTPase. Rac 1 GTPase in turn controls the polymerization of actin through the activation of Pak-1. All these processes finally lead to the extension of filopodia that fold back onto the cell membrane to form large irregular macropinosomes [29]. HTLV-1 entry was blocked in immature and LPS-matured IL-4 DCs by the PI3K inhibitor wortmanin, the PKC inhibitors rottlerin and Gö6976, and inhibitors of Rac 1 (NSC23766) and Pak1 (IPA-3) (Fig. 6B). This further confirms the implication of macropinocytosis in HTLV-1 entry in these subsets. Interestingly, compared to entry in IL-4 DCs, HTLV-1 entry in LPS-matured DCs was more reduced after treatment with genistein, rottlerin and NSC, less reduced after treatment with Gö6976 and not blocked by the inhibitor of actin fibers elongation cytochalasin D (Fig. 6B), suggesting the involvement of a different macropinocytosis process in LPS-matured DCs. Finally, HTLV-1 entry in immature and LPS-matured IL-4 DCs was not blocked by nocodazole and blebstatin, suggesting that microtubule or myosin contraction are

not involved in the macropinocytosis process of HTLV-1 entry (S6E Fig.). Altogether, these results demonstrate that HTLV-1 entry in immature and LPS-matured IL4-DCs requires macropinocytosis as well as clathrin-mediated endocytosis while entry in IFN- $\alpha$  DC used mainly clathrin-mediated endocytosis.

### **Acidic pH of vesicles decreases DC infection.**

Since HTLV-1 entry pathways, and intracellular localization are similar in immature IL-4 DCs that are susceptible to infection and in IFN- $\alpha$  DCs that are resistant to infection, we next wondered whether intravesicular pH could modify the ability of the virus to establish a productive infection. Indeed, previous studies reported that immature DCs have vesicles with neutral pH, while vesicles pH is more acidic in mature DCs [30]. Using acidic lysotracker, which fluorescence intensity is dependent on acidic pH, and using drugs that induce intravesicular acidification (diphenyleneiodonium DPI) or alkalization (chloroquine), we were able to modulate and monitor the pH of vesicles. The neutral pH of vesicles in immature IL-4 DC was acidified after DPI treatment (Fig. 7A), while the slightly more acidic pH of vesicles in IFN- $\alpha$  DCs was alkalized after chloroquine treatment (Fig. 7D). As a control, the acidic pH of vesicles in LPS-treated DCs was alkalized after chloroquine treatment (Fig. 7G). IL-4 DCs treated with DPI captured similar amount of HTLV-1 than untreated IL-4 DCs when co-cultured with C91PL (Fig. 7B). However, productive infection was significantly reduced under these conditions (Fig. 7C). This suggests that HTLV-1 trafficking into acidic vesicles inhibits productive infection of IL-4 DCs. In contrast, in the same co-culture conditions, chloroquine treatment of IFN- $\alpha$  DCs, reduced viral capture to a level similar to that of IL-4 DCs, (Fig. 7E). In addition, Tax expression was significantly increased in chloroquine-treated IFN- $\alpha$  DCs compared to IFN- $\alpha$  DCs, although it did not reach the level of Tax expression in IL-4 DCs (Fig. 7F). This suggests that productive infection is only partially restored by alkalization of

IFN- $\alpha$  DC vesicles. Similar results were obtained after treatment of LPS-matured DCs before their co-culture with C91-PL (Fig. 7H and 7I), further suggesting that alkalization of matured DC vesicles partially restores productive infection. Altogether, our results suggest that productive infection of DCs by HTLV-1 requires a neutral pH of vesicles and an immature phenotype of the DCs.

### **Productive infection of DCs is required for viral transfer to T-cells.**

We have previously shown that productive infection of IL-4 DCs was the main route of HTLV-1 transmission to lymphocytes, although passive transfer from HTLV-1-exposed IL-4 DCs in presence of AZT may have occurred in rare cases [9]. This passive transfer, also known as “trans-infection” (for a review see [31]), results from transmission of captured viral particles without productive infection, and is the main route used by HIV-1 for spreading to T-cells [32]. Since viral capture is around three-fold higher in LPS-matured DCs (see Fig. 4E) and six-fold higher in IFN- $\alpha$  DCs (see Fig. 2D) than in IL-4 DCs, we hypothesized that trans-infection might occur preferentially with mature DCs compared to IL-4 DCs. IL-4 DCs, LPS-treated DCs or IFN- $\alpha$  DCs were thus exposed to C91-PL for 3 h to allow viral capture, and then separated from C91-PL using positive selection with anti-BDCA-4 antibodies. We controlled that the DC phenotype was not changed after the purification process (S7A and S7B Fig.) and allowed the removal of at least 95 % of C91-PL (S7C Fig.). Purified DCs were then co-cultured for 2 days with Jurkat LTR-Luc reporter cells, (Fig. 8A). Luciferase signals significantly decreased when co-culture was performed with LPS-treated IL-4 DCs or IFN- $\alpha$  DCs, compared to co-culture with IL-4 DCs (Fig. 8A). Interestingly, when IFN- $\alpha$  DCs were treated with chloroquine before co-culture with C91-PL, luciferase signals were significantly higher compared to co-culture with untreated IFN- $\alpha$  DCs (Fig. 8A see graph). These results suggest that although HTLV-1 capture is higher in mature DCs,

internalized virus in acidic vesicles cannot be transferred to T-cells. To control that the decreased luciferase signals were not due to a decreased ability of IFN- $\alpha$  or LPS-treated DCs to engage cell-to-cell contacts with Jurkat-LTR-Luc cells, we counted the number of DC-Jurkat-LTR-Luc conjugates in co-cultures containing DCs, C91-PL and Jurkat-LTR-Luc cells. To distinguish the different cell types in the co-culture, C91-PL were stained with a cell tracker and appeared in red, while Jurkat-LTR-Luc cells were transduced with GFP-expressing lentivectors, and appeared in green. DCs were left unstained (Fig. 8B). The number of cell conjugates between unstained DCs and GFP-labelled Jurkat-LTR-Luc cells after 3 h of co-culture did not change significantly when IL-4, IFN- $\alpha$  or LPS-treated DCs were used (Fig. 8B, see graph), suggesting that decreased viral transfer from IFN- $\alpha$  DCs and LPS-treated DCs was not due to a lack of contacts with Jurkat cells. Next, IL-4 DCs, LPS-treated DCs or IFN- $\alpha$  DCs were exposed to C91-PL for 3 h, purified using positive selection with anti-BDCA-4 antibodies and cultured for three days to allow productive infection. Then, Jurkat-LTR-Luc reporter cells were added in the MDDCs culture and luciferase signals monitored two days later (Fig. 8C). In that setting, IL-4 DCs were able to transfer significant amounts of HTLV-1 (Fig. 8C), while reduced luciferase signals were detected using LPS-treated IL-4 DCs or IFN- $\alpha$  DCs (Fig. 8C), confirming that productive infection is required to allow virus transfer to T-cells. This was further controlled using AZT treatment, which significantly reduced luciferase signals.

Surprisingly, AZT treatment of LPS-treated IL-4 DC or IFN- $\alpha$  DC also reduced luciferase signals observed with the untreated DC subsets, suggesting that the viral transfer observed with these subsets relies on their productive infection and not on long term viral capture (Fig. 8C). In addition, when IFN- $\alpha$  DCs were treated with chloroquine before their exposure to C91-PL and their purification, viral transfer to T-cells was partially restored, but only in the absence of AZT.

Altogether, these results suggest that viral transmission from DCs to T-cells mainly results from transmission of newly synthesized virus from productively infected DCs, and not from passive transmission after viral capture by LPS-matured or IFN- $\alpha$  DCs.

## Discussion

Apart from circulating CD4<sup>+</sup> T lymphocytes that represent the main infected cell population in chronically infected individuals, HTLV-1 proviral DNA is also detected in antigen presenting cells (APCs) such as myeloid DCs [33], monocytes and plasmacytoid DCs [11]. We previously showed that *in vitro* MDDCs are more susceptible to HTLV-1 infection than autologous primary T-cells [9], supporting a model in which DCs would be the first cells to be infected during primary infection. *In vivo*, DCs come with different flavors and functions depending on their location in the body. Thus, virus interaction with DCs may have different outcomes depending on the nature of the DCs encountered in the course of infection. In this study, we used dendritic cells differentiated *in vitro* from human monocytes to generate different DC subsets mimicking those present *in vivo*. We demonstrate for the first time that DCs are not all equally susceptible to HTLV-1 infection. While immature DCs are more susceptible than tolerogenic-TGF- $\beta$  DCs to HTLV-1 infection, inflammatory DCs and mature DCs are resistant to HTLV-1 infection.

Surprisingly, resistance is neither due to the presence of high level of type-I interferon produced by inflammatory DCs or mature DCs, nor to the exogenous recombinant interferon used to generate those DCs. Interestingly, these results are different from previous reports, including ours, obtained in T-cells, which showed that their susceptibility to HTLV-1 infection is sensitive to IFN- $\alpha$  [23,27]. Of note, cell-type-dependent susceptibility to IFN has already been reported and was linked to the use of cell-type-specific patterns of STAT activation as well as to usage of additional signaling components that can finely tune ISG expression in a given cell type [34,35].



In addition, substantial quantitative differences in STAT activation in different cell-types may be linked to the induction of the same ISG but with different amplitude [36]. In T-cells, treatment with exogenous IFN- $\alpha$ 2 results in a block in HTLV-1 protein expression, due to protein kinase R (PKR) activation while the early steps of the viral cycle are maintained [23]. Strikingly, it was shown that treatment with recombinant IFN- $\alpha$ 2 induced a higher expression of PKR in DCs than in T-cells [36]. Thus, our results, which demonstrate a lack of antiviral control in DCs after IFN treatment, suggest that PKR induction in DCs might not be as efficient as in T-cells to restrict HTLV-1 infection. Alternatively, PKR phosphorylation that is required for its antiviral activity might not be present or sufficient in DCs treated with type I IFN. In addition, PKR antiviral activity could be counterbalanced by the concomitant induction of ADAR-1 (Adenosine Deaminase Acting on RNA type 1), another ISG that has been shown to enhance replication of several viruses [37]. Interestingly, ADAR-1 expression in T-cells suppresses IFN- $\alpha$  inhibitory effect on HTLV-1 expression through the repression of PKR phosphorylation [38]. Thus, the inability of IFN- $\alpha$  to restrict HTLV-1 infection in DCs might be the result of an unbalanced expression of ADAR-1 over that of PKR.

Our results also demonstrated that restriction was not due to a lack of viral entry in mature DCs, although the level of viral binding receptors is lower than in susceptible DCs. This suggests that viral capture by DCs that have been exposed to infected cells may use other receptors. Interestingly, HTLV-1 was observed in CD82 positive compartment in all DC subsets. CD82 is a tetraspanin receptor located in MVBs and at the plasma membrane, and has been shown to interact with the HTLV-1 envelope glycoprotein in T-cells [39]. Thus, one could hypothesize that CD82 is used by HTLV-1 to enter DCs during cell-to-cell transfer, and maybe involved in the targeting of HTLV-1 to vesicles in DCs. This is currently under investigation in our laboratory. Indeed,

localization of incoming viruses in vesicles in both susceptible and resistant DCs could reflect a distinct entry route in these cell types compared to T-cells, in which it is assumed that HTLV-1 entry occurs after fusion at the plasma membrane [40]. We observed that the level of the fusion receptor Glut-1 is similar in the three DC subsets, suggesting that HTLV-1 capsids could be delivered to the cytosol after fusion of the viral envelope with the membrane of the vesicles. Accordingly, both in susceptible DCs and in restricted DCs in which vesicles had been alkalized after treatment with chloroquine, Tax expression was detected. This indicates that the viral cycle can be completed after the virus had trafficked through the endocytosis pathway. In contrast, Tax was not detected in susceptible DCs in which vesicles had been acidified after treatment with DPI, thus in which incoming vesicular viruses had been inactivated. This suggests that viral fusion at the plasma membrane, even if it is present, does not allow a productive infection. Vesicular uptake of viruses may not be limited to DCs and could be a feature of cell-to-cell transmission. Indeed, such a mechanism was also reported during HIV-1 cell-to-cell transfer between T-cells [41,42,43]. In that case, viral fusion occurred in the vesicles of the target cells after the late maturation of Gag proteins, authorizing the interaction of HIV-1 envelope with its co-receptor and thus the release of HIV-1 capsids into the cytoplasm, and subsequent productive infection [44]. It is thus possible that similar entry pathways occur during HTLV-1 cell-to-cell transmission.

We showed here that maturation of DCs strongly limited their productive infection. Interestingly, it was shown that stimulation of primary hepatocytes with TLR agonists was able to inhibit replication of woodchuck hepatitis B virus (WHBV) in an interferon-independent pathway [45]. In this study, restriction was not due to the expression of a soluble factor nor to activation of JAK/STAT pathway that is specific to IFN signaling, but was induced by TLR signaling via activation of the MAPK/ERK and PI-3K/Akt pathways. It was therefore suggested that TLR-

induced proteins could act as restriction factors. We cannot exclude that maturation of DCs may induce HTLV-1 specific restriction factors. However, our results suggest that the first mechanism of HTLV-1 replication restriction relies on a post entry blockade and on specific viral trafficking.

DC maturation is a complex process that modifies DC function such as antigen capture, antigen processing and presentation. Pathogen capture mainly occurs via macropinocytosis, a non-receptor mediated endocytic pathway. Macropinocytosis is a constitutive process in immature DCs [46], while it is switched to an induced process in mature DCs [47]. Indeed, in the absence of pathogen-induced signaling, mature DCs have lower abilities to internalize pathogens compared to immature DCs. Interestingly, we showed here that HTLV-1 entry was blocked by genistein, an inhibitor of induced macropinocytosis but not by cytochalasin D, a drug acting on actin fibers elongation in mature but not in immature DCs. This suggests distinct actin requirements that may be relevant to mechanisms specific to constitutive versus induced macropinocytosis.

These entry mechanisms may be consistent with the intracellular localization of HTLV-1 in the different subsets. Interestingly, earlier studies using electron microscopy analyses of MDDCs co-cultured with HTLV-1-infected lymphocytes, showed viral particles internalized in vesicles [6], although the nature of these vesicles was not identified. Our results showed that in all DCs subsets, viruses were found in large vesicles also positive for tetraspanin but not for early endosome marker. This staining is evocative of MVB, and is reminiscent of the Virus-Containing Compartments (VCC) described in HIV-1 infected macrophages [48,49,50,51,52,53,54,55,56].

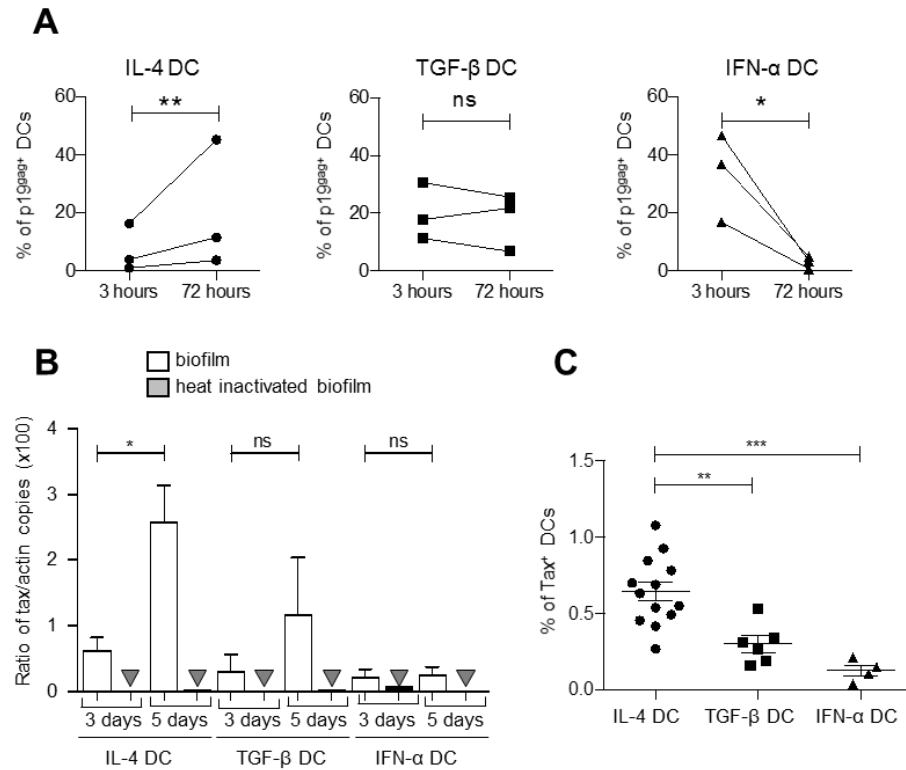
Thus, based on all our results, we propose a schematic model for HTLV-1 infection of DC subsets (Fig. 9). When HTLV-1 encounters immature DCs, viral entry through constitutive macropinocytosis would lead to internalization of HTLV-1 in MVB-like compartments from which the neutral pH would authorize viral capsid exit and completion of the viral replication cycle

(Fig. 9A, left panel). In contrast, in IFN- $\alpha$  DCs, entry through clathrin-mediated endocytosis and not through macropinocytosis would lead to trafficking in vesicles targeted to degradation (Fig. 9B). Finally, if DCs are matured before their interaction with HTLV-1, entry using constitutive macropinocytosis would deliver viruses to vesicles with an acidic pH, that would impair HTLV-1 infection (Fig. 9A, right panel). Surprisingly, alkalization of vesicles from mature DCs using chloroquine restored HTLV-1 infection, but only partially with a percentage of infection around 60% lower than that observed in immature DCs. This suggests that in addition to the traffic in acidic compartments, induction of HTLV-1-specific restriction factors induced after DC maturation would insure an efficient blockade of HTLV-1 replication in mature DCs.

Are these different outcomes of HTLV-1 infection in the different DC subsets important for the virus transfer to T-cells? In the HIV-1 model, DCs are resistant to HIV-1 infection due to the presence of several restriction factors [57], and thus most of the viral transfer from DCs to T-cells occurs by trans-infection, which does not require productive infection [58]. More importantly, DC-mediated trans-infection is more efficient when HIV-1 virions have been captured by mature DCs [31,59]. Interestingly, DC maturation with TLR agonists also renders them susceptible to X4-tropic HIV-1 infection, although they are still resistant to infection with R5-tropic HIV-1 [60]. This suggests that DC infection with HIV-1 is controlled by several factors that depend upon the DC maturation status and upon HIV-1 strains. Depending on the viral strain, transfer of HIV-1 from DCs to T-cells would use either trans-infection in the case of R5-tropic viruses or cis-infection in the case of X4-tropic viruses. In any case, mature DCs would be responsible for the efficient transfer to T-cells and rapid spreading of HIV-1 within individuals [32]. During HTLV-1 infection, interaction with DCs is also important for the establishment of the chronic infection of T-cells [15,61]. However, since this infection has not been linked to immune activation, HTLV-

1 might more likely interact with immature DCs. Thus, our results showing that immature DC are the only subset able to transfer the virus to T-cells, in a process mainly based on their productive infection, is relevant to the *in vivo* situation. The nature of the DCs encountered by HTLV-1 upon primo-infection, which display a differential susceptibility to HTLV-1 infection, would therefore determine the efficiency of viral transmission to T-cells. Finally, in contrast to the dissemination of HIV-1 by mature DCs, our results strongly suggest that the restriction of HTLV-1 infection in mature DCs and more importantly, their inability to transfer the virus to T-cells might be an efficient way for the host to limit HTLV-1 spread.

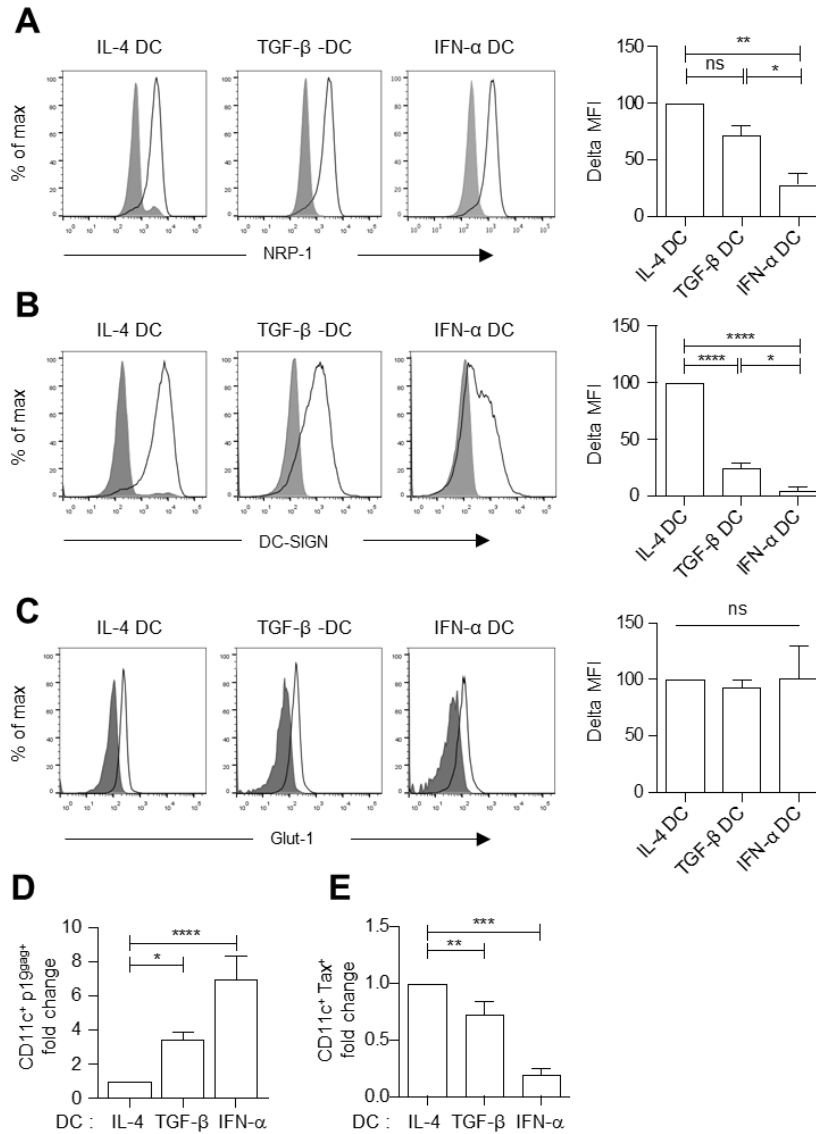
Figure 1



**Figure 1: IL-4 DCs, TGF-β DCs and IFN-α DCs are not equally susceptible to HTLV-1 infection.**

(A) MDDCs were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells, and the percentage of MDDCs expressing the viral p19<sup>Gag</sup> protein was assessed by flow cytometry after 3h to measure viral capture or 72h to measure *de novo* viral expression by productively infected MDDCs. MDDCs were discriminated from C91-PL cells by CD11c gating. The results obtained from MDDCs differentiated from the same blood donor are shown as percentage of p19<sup>Gag</sup> protein present in DCs during the time course. Results for 3 independent experiments performed on different donors are shown. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using a paired t-test: \*\*p<0.01; \*p<0.05; ns: non significant. (B) MDDCs were exposed to purified viral biofilm or heat-inactivated biofilm. Genomic DNA was extracted 3 days or 5 days post-exposure and analyzed by real-time PCR. Results are presented as the ratio of *tax/actin* obtained from 3 independent experiments performed on different donors. Mean values are indicated. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using a t-test: \*p<0.05; ns: non significant. (C) MDDCs were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 days and the percentage of MDDCs expressing the viral Tax protein determined by flow cytometry. The mean value of at least 4 independent experiments obtained with different blood donors is indicated. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test: \*\*\*p<0,001; \*\*p<0.01.

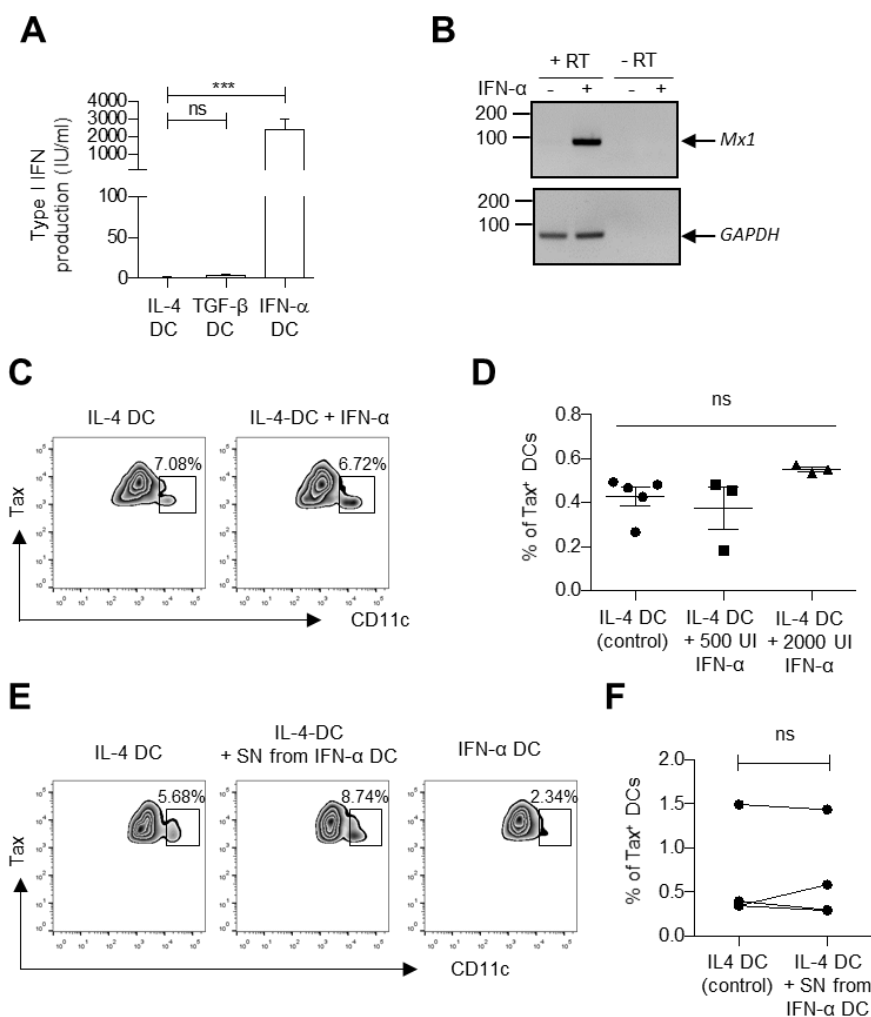
Figure 2



**Figure 2: Expression of HTLV-1 receptors in IL-4 DCs, TGF-β DCs and IFN-α DCs is inversely correlated to HTLV-1 capture, but correlated to HTLV-1 productive infection.**

(A-C) Cells were labeled with fluorochrome-coupled antibodies (black lines) directed against (A) NRP-1, (B) DC-SIGN and (C) Glut-1. Cells stained with matched isotype antibodies were used as negative controls (solid grey graphs). Quantification of the mean fluorescence intensity is represented on the right of each panel as the  $\Delta$  mean fluorescence intensity detected in stained versus unstained cells. Results obtained in 3 independent experiments performed on 3 different donors are presented as percentage of receptor expression normalized to the expression detected in IL-4 DCs. (D) IL-4, TGF-β and IFN-α DCs were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 h, and the percentage of MDDCs expressing the viral p19<sup>gag</sup> protein was assessed by flow cytometry. The mean values from at least 4 independent experiments obtained with different donors were normalized to the percentage of p19<sup>gag</sup> protein detection in IL-4 DCs, and presented as fold change. (E) IL-4, TGF-β and IFN-α DCs from the same blood donors were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 days and productive infection assessed by flow cytometry allowing viral Tax detection. The number of DCs expressing the viral Tax protein was determined and normalized to the number detected in IL-4 DCs. Results are presented as fold changes. (A-E) Asterisks indicate statistically significant differences calculated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test: \*\*\*\*p<0.0001; \*\*\* p<0.001; \*\*p<0.01; \*p<0.05; ns: non significant.

Figure 3

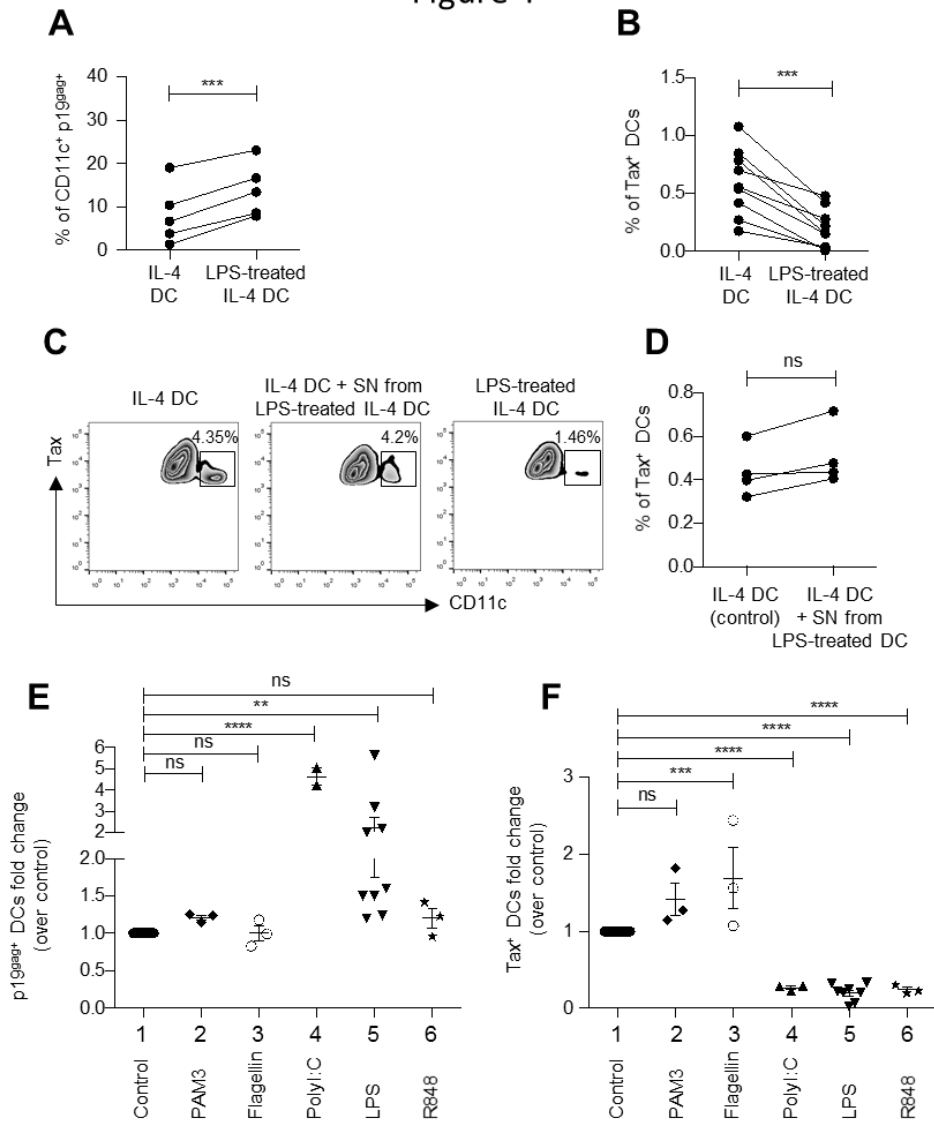


**Figure 3: Recombinant IFN- $\alpha$  or supernatant from IFN- $\alpha$  DCs is inefficient to restrict infection of IL-4 DCs.**

(A) Supernatant from IL-4, TGF- $\beta$  and IFN- $\alpha$  DCs derived from the same donors were collected after differentiation and type I IFN levels measured using HL116 reporter cells expressing ISRE-Luc. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test: \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns: non significant. (B) IL-4 DCs were treated with 500 IU/ml of recombinant IFN- $\alpha$  for 18 h, or left untreated as a control. Total RNA was extracted and retro-transcribed (RT). PCR was performed using *Mx-1* or *GAPDH* specific primers. Absence of DNA contamination was controlled using PCR amplification on total RNA in the absence of RT treatment. (C) IL-4 DCs were treated or not with recombinant IFN- $\alpha$  (500 or 2000 UI/sml) before co-culture with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 days, and Tax expression was measured. Cells from the co-culture were first gated on Tax expression and then on CD11c expression. The Tax-expressing DC population is shown in the box, as well as the percentage of Tax expressing DC in the Tax positive population. A representative experiment is shown as zebra plots. (D) The percentage of infected CD11c<sup>+</sup> Tax<sup>+</sup> DCs was determined after treatment of IL-4 DCs with increasing amounts of recombinant IFN- $\alpha$  2a. Results from at least 3 independent experiments with different donors are shown. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA: ns: non significant. (E) IL-4 DCs were treated or not with the supernatant from IFN- $\alpha$  DCs before co-culture with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 days, and Tax expression was measured. IFN- $\alpha$  DCs were included as a control. Cells were then gated and results represented as in (C). (F) The results from 4 independent experiments obtained with different donors are presented as in (D). Statistical analysis was performed using a t-test: ns: non significant.

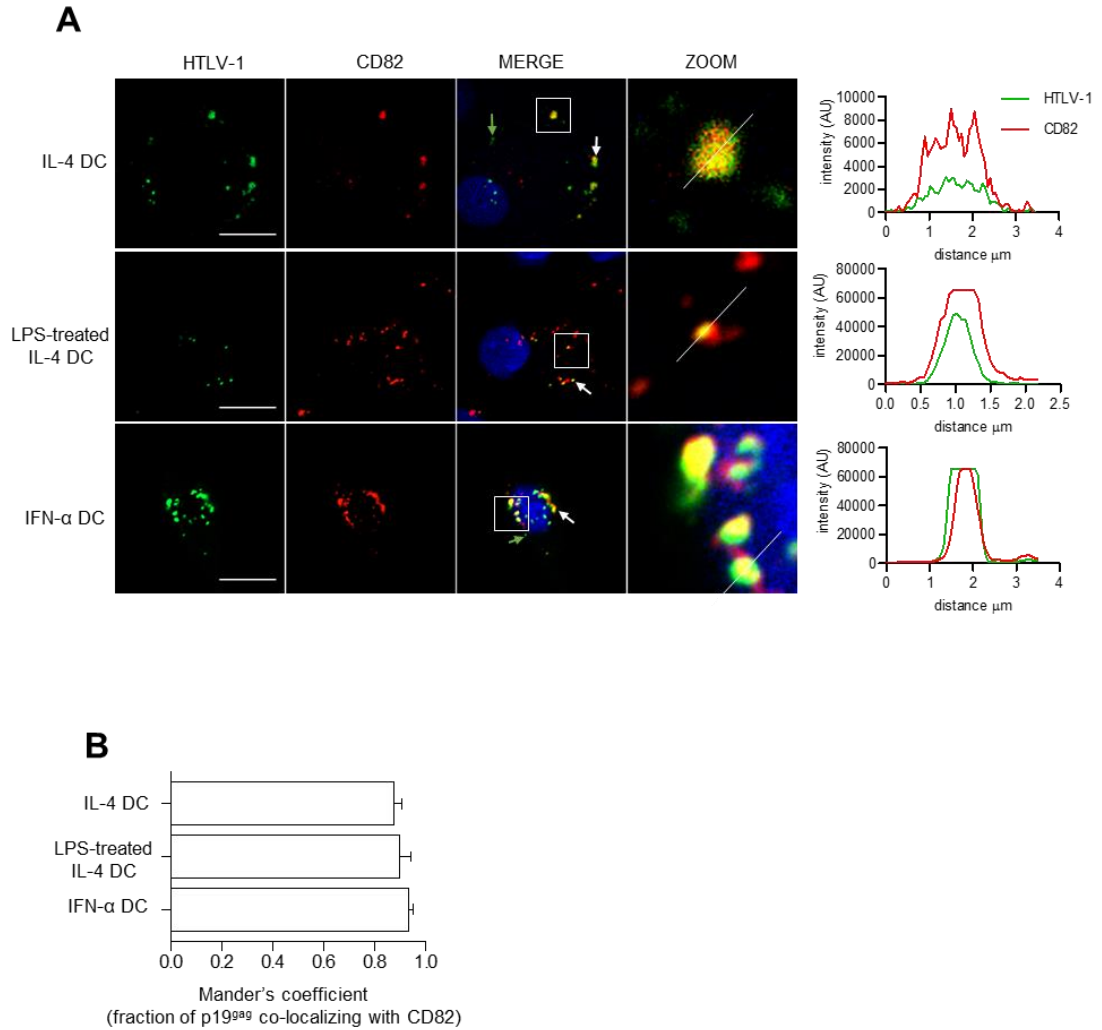


Figure 4



**Figure 4: DC maturation is responsible for restriction of HTLV-1 productive infection.** (A) IL-4 DCs were treated with the TLR-4 ligand LPS before co-culture with C91-PL for 3 h, and viral capture measured by flow cytometry using p19<sup>Gag</sup> detection. Untreated IL-4 DCs were used as a control. The percentage of DCs expressing p19<sup>Gag</sup> is shown for immature IL-4 DCs and LPS-treated IL-4 DCs from the same donor. Results from 5 independent experiments performed on different donors are shown. Statistical analysis was performed using a t-test: \*\*\* $p < 0.001$ . (B) IL-4 DCs were treated with LPS before co-culture with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 days, and productive infection measured by flow cytometry using Tax protein detection. Untreated IL-4 DCs were used as a control. The percentage of DCs expressing Tax is shown for immature IL-4 DCs and LPS-treated IL-4 DCs from the same donor. Paired results from 9 independent experiments performed on different donors are shown. Statistical analysis was performed using a t-test: \*\*\* $p < 0.001$ . (C) IL-4 DCs were treated or not with the supernatant from LPS-treated DCs (middle plot) before co-culture with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 days, and Tax protein expression was measured. LPS-treated DCs were included as a control (right plot). Cells from the co-culture were first gated on Tax expression and then the infected DC population expressing Tax was determined on CD11c expression. A representative experiment is shown as zebra plots with the infected Tax<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC population squared, and the percentage of Tax expressing DCs in the Tax positive population is indicated. (D) The percentage of DCs expressing Tax was measured for IL-4 DCs (control) or for IL-4 DCs treated with the supernatant from LPS-treated DCs from the same donor co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 days. Results from 4 independent experiments performed on different donors are shown. Statistical analysis was performed using a t-test: ns: non significant. (E) IL-4 DCs were left untreated as controls or treated with the TLR-2 ligand PAM3CSK4, the TLR-5 ligand flagellin, the TLR-3 ligand PolyI:C, the TLR-4 ligand LPS or the TLR-7/8 ligand R848 before co-culture with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 h, and viral capture measured by flow cytometry using p19<sup>Gag</sup> staining. The percentage of DCs stained for p19<sup>Gag</sup> was determined and normalized to that of control IL-4 DCs. Results from at least 3 independent experiments performed on different donors are represented as fold increase over control. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test: \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\* $p < 0.01$ , ns: non significant. (F) IL-4 DCs were left untreated or treated with the TLR-2 ligand PAM3CSK4, the TLR-5 ligand flagellin, the TLR-3 ligand PolyI:C, the TLR-4 ligand LPS or the TLR-7/8 ligand R848 before co-culture with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 days, and productive infection measured by flow cytometry using Tax expression. The percentage of Tax expressing DCs was determined and normalized to that of control IL-4 DCs. Results from at least 3 independent experiments performed on different donors are represented as fold increase over control. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test: \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ns: non significant.

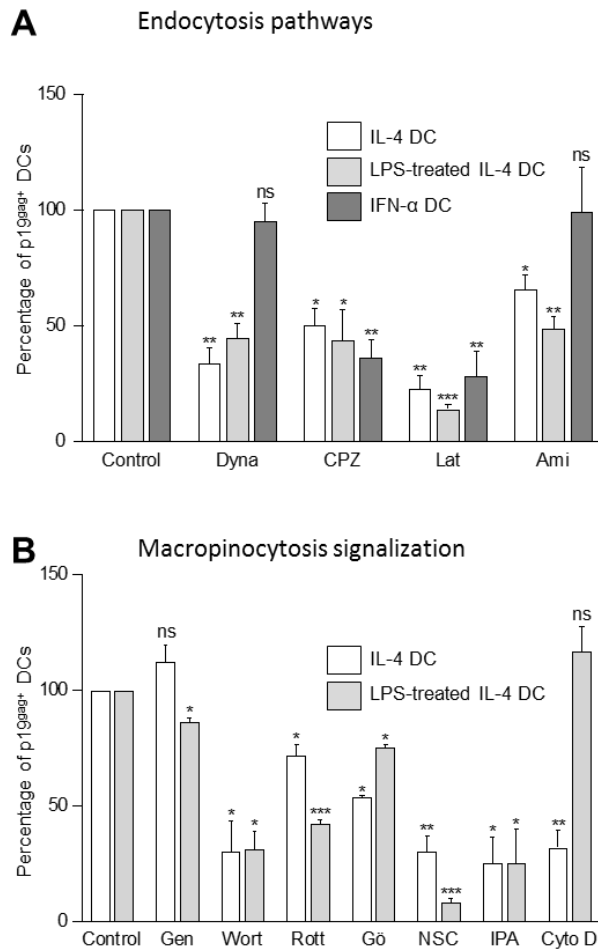
Figure 5



**Figure 5: HTLV-1 localizes in CD82<sup>+</sup> vesicles after capture by DCs.**

(A) IL-4 DCs, LPS-treated IL-4 DCs and IFN- $\alpha$  DCs were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 h, and immunostained for HTLV-1 (green) and CD82 (red) before analysis by confocal microscopy. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). White arrows show co-localization of HTLV-1 and CD82. Green arrows show vesicles stained with HTLV-1 only. Representative images obtained by confocal microscopy are shown. HTLV-1 and CD82 signals were quantified along the segment represented on the zoom panel and plotted on the histogram. Scale bars = 10  $\mu\text{m}$ . (B) Co-localization of HTLV-1 signal with CD82 signal was calculated using Mander's coefficient.

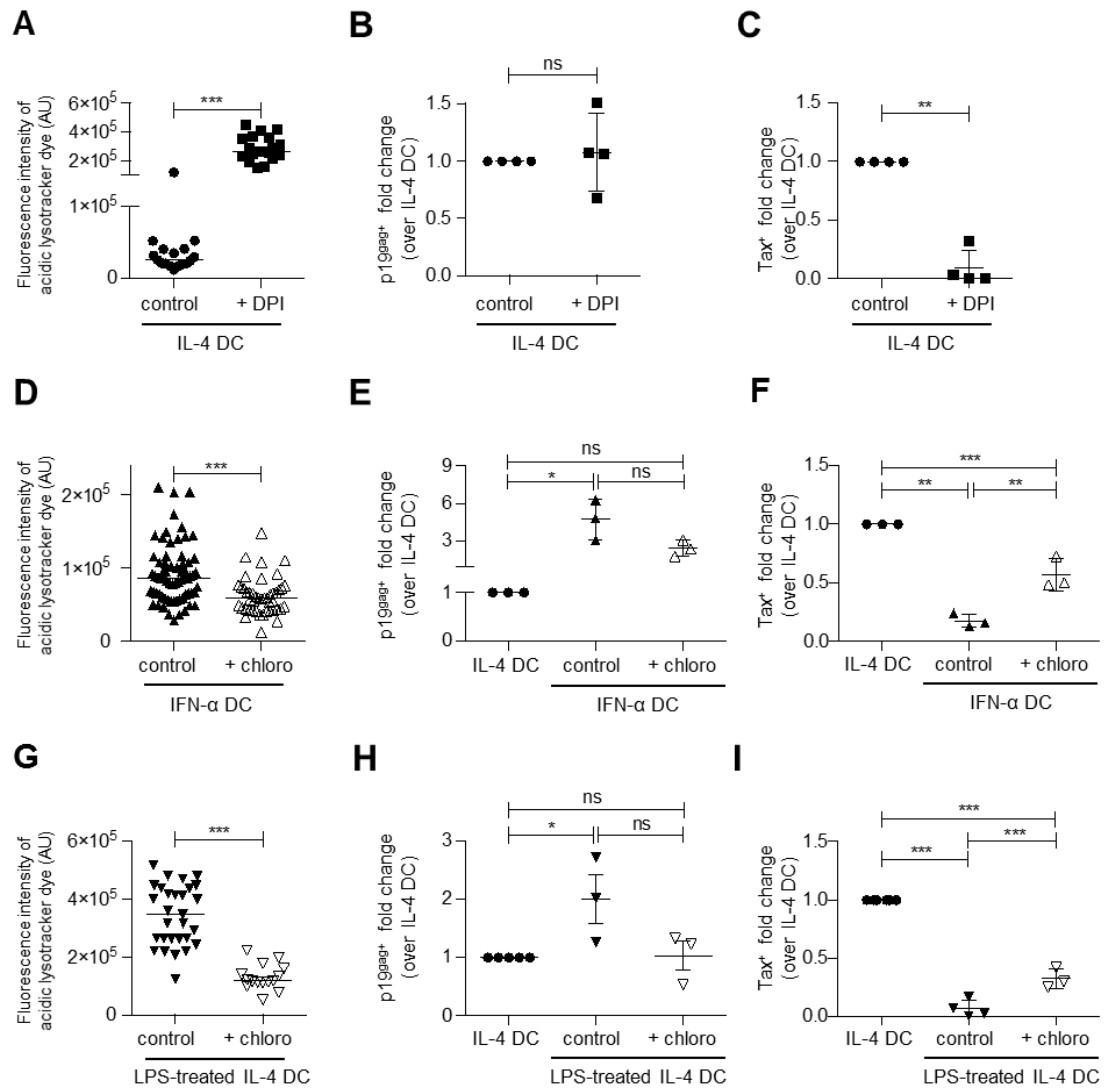
Figure 6



**Figure 6: HTLV-1 uses macropinocytosis pathways to enter into IL-4 DCs and LPS-stimulated IL-4 DCs, but not in IFN- $\alpha$  DCs.**

(A-B) IL-4 DCs (white bars), LPS treated IL-4 DCs (light gray bars) or IFN- $\alpha$  DCs (dark gray bars) were treated for 3 h with (A) clathrin-mediated endocytosis inhibitors (chlorpromazine, CPZ), dynamin II inhibitors (dynasore, Dyna), actin polymerization inhibitors (latrunculin, lat) or macropinocytosis inhibitors (amiloride, ami) or (B) constitutive macropinocytosis inhibitors (genistein, Gen), PI3K inhibitor (wortmanin, Wort), PKC inhibitors (rottlerin, Rott and Gö6976), Rac-1 inhibitors (NSC23766, NSC), Pak-1 inhibitor (IPA-3, IPA), and actin inhibitor (Cytochalasin D, Cyto D). After treatment, DCs were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 h and viral capture determined by flow cytometry using p19<sup>gag</sup> staining. DCs treated with DMSO, ethanol or medium depending on the solvent used for inhibitor solubilization (see material and methods section) were used as controls. The percentage of DCs positive for p19<sup>gag</sup> was determined for each condition and normalized to that of the untreated control DCs. Results were obtained from 3 independent experiments performed with different blood donors. Asterisks indicate statistically significant differences between treated and untreated DCs calculated using a t-test: \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; ns: non significant.

Figure 7

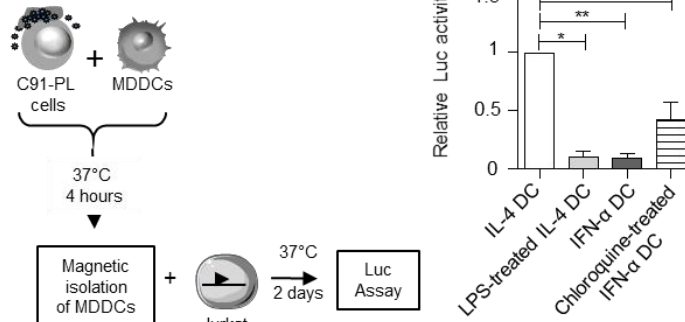


**Figure 7: Acidic pH of vesicles decreases DC infection.**

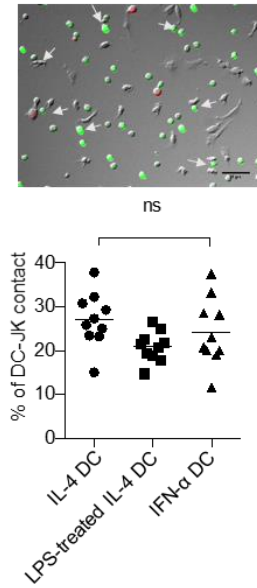
(A) IL-4 DCs were treated with 10 $\mu$ M DPI for 3 h and incubated for 30 minutes with a pH-sensitive lysotracker fluorescent dye. Fluorescence intensity was determined using Image J software. Results are representative of at least three independent experiments performed on different donors. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using a t-test: \*\*\* p<0.001. (B) DPI-treated IL-4 DCs or untreated IL-4 DCs control were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 h. Viral capture was measured by flow cytometry using p19<sup>98E</sup> staining. The percentage of p19<sup>98E</sup>-positive DCs was normalized to that of IL-4 untreated control DCs and presented as fold changes over control. Results are representative of 4 independent experiments performed on different donors. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using a t-test: ns: non significant. (C) DPI-treated IL-4 DCs or untreated IL-4 DCs control were co-cultured with mitomycin-treated C91PL cells for 3 days. Productive infection was measured by flow cytometry using Tax staining. The number of Tax-expressing DCs was normalized to that of IL-4 untreated control DCs and presented as fold changes over control. Results are representative of 4 independent experiments performed on different donors. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using a t-test: \*\* p<0.01. (D) IFN- $\alpha$  DCs were treated for 3 h with 150 $\mu$ M chloroquine, and incubated with lysotracker fluorescent dye for 30 minutes. Fluorescence intensity determined using ImageJ software was compared using a t-test: \*\*\* p<0.001. Results are representative of at least 3 independent experiments performed on different donors. (E) Chloroquine-treated IFN- $\alpha$  DCs or untreated IFN- $\alpha$  DCs used as controls were co-cultured with C91-PL cells for 3 h. Viral capture was measured by flow cytometry using p19<sup>98E</sup> staining. The percentage of p19<sup>98E</sup>-positive DCs was normalized to that of IL-4 untreated control DCs and presented as fold change over control. Results are representative of at least 3 independent experiments performed on different donors. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test: \* p<0.05 ns: non significant. (F) Chloroquine-treated IFN- $\alpha$  DCs or untreated IL-4 and IFN- $\alpha$  DCs used as controls were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 days. Productive infection was measured by flow cytometry using Tax detection. The number of Tax-expressing DCs was normalized to that of IL-4 untreated control DCs and presented as fold changes over control. Results are representative of 3 independent experiments performed on different donors. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test: \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01. (G) LPS-treated IL-4 DCs were treated for 3 h with 150 $\mu$ M chloroquine, and incubated with lysotracker fluorescent dye for 30 minutes. Fluorescence intensity was determined using Image J software and compared using a t-test: \*\*\* p<0.001. Results are representative of at least 3 independent experiments performed on different donors. (H) Chloroquine-treated LPS-matured IL-4 DCs or untreated IL-4 and LPS-matured IL-4 DCs used as controls, were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 h. Viral capture was measured and presented as in (E). Results are representative of 3 independent experiments performed on different donors. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test: \* p< 0.05, ns: non significant. (I) Chloroquine-treated LPS-matured IL-4 DCs or untreated IL-4 and LPS-matured IL-4 DCs used as controls, were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 days. Productive infection was measured and presented as in (F). Results are representative of 4 independent experiments performed on different donors. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test: \*\*\*p<0.001.

Figure 8

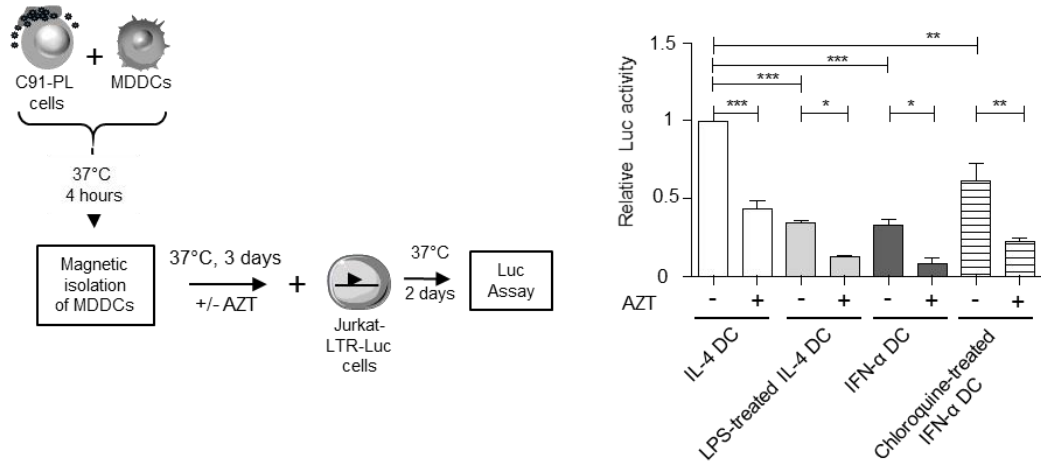
**A** Trans-infection assay



**B** DC-JK contacts



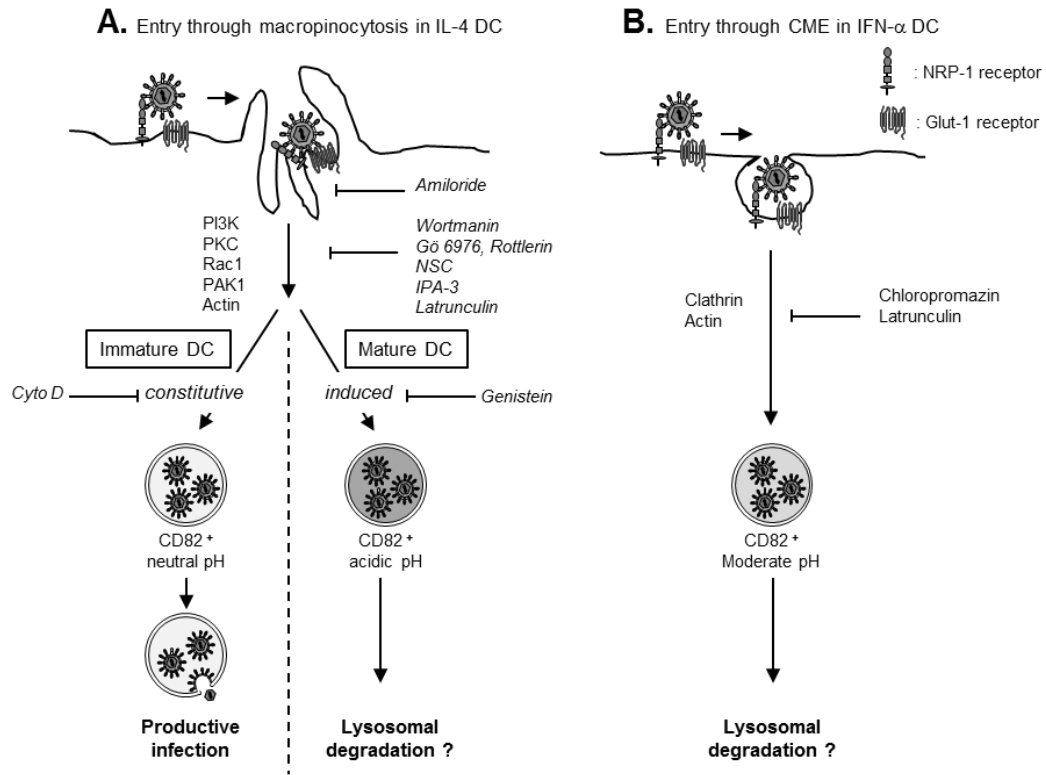
**C** Cis-infection assay



**Figure 8: HTLV-1 is transferred to reporter T-cells from IL-4 DCs but not from LPS-treated or IFN-α DCs.**

(A) DCs were exposed to mitomycin-treated C91-PL cells for 4 h and isolated from C91-PL using positive selection with magnetic beads coated with anti BDCA-4 antibodies. Then, purified MDDCs were co-cultured with Jurkat-LTR-Luc cells and luciferase activity was assessed after 2 days. When indicated, IFN-α DCs were treated with chloroquine before their exposure to C91-PL. The graph shows the means and the standard deviations from 3 independent experiments obtained with different donors. Background signal due to leaky luciferase activity of Jurkat-LTR-Luc cells was subtracted and results were normalized to the luciferase activity of Jurkat-LTR-Luc measured after co-culture with IL-4 DCs and presented as fold change over control. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test: \* p<0.05, \*\* p<0.01. (B) DCs were mixed with GFP-transduced Jurkat-LTR-Luc cells and C91-PL cells stained with a red cell tracker, and contacts were visualized by fluorescence microscopy. Arrows indicate contacts between unstained DCs and GFP-transduced Jurkat-LTR-Luc cells (JK). Scale bar = 50µm. Contacts between DCs and GFP-transduced Jurkat-LTR-Luc cells were manually counted, normalized to the number of DCs in the picture analyzed, and represented as percentages. Statistics were performed using one-way ANOVA. ns: non significant. (C) DCs were exposed to mitomycin-treated C91-PL cells for 4 h, isolated by positive selection and cultured for 3 days, in presence or absence of AZT. Then, Jurkat-LTR-Luc cells were added and luciferase activity was assessed 2 days later. When indicated, IFN-α DCs were treated with chloroquine before their exposure to C91-PL. The graph shows the means and the standard deviations from 3 independent experiments obtained with different donors. Results were normalized to the luciferase activity of Jurkat-LTR-Luc measured after co-culture with IL-4 DCs and presented as fold changes over control. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test: \*\*\*p<0.001, \*\* p<0.01, \*p<0.05.

Figure 9

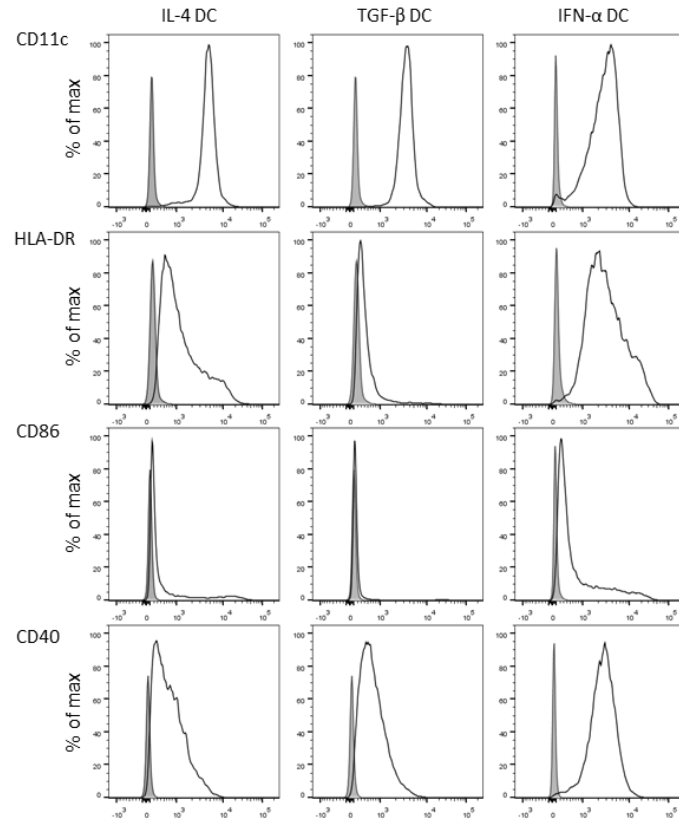


**Figure 9: Schematic representation of HTLV-1 entry in IL-4, LPS-treated IL-4, and IFN- $\alpha$  DCs.**

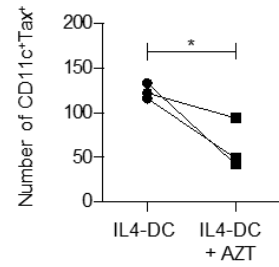
(A) Entry through macropinocytosis in IL-4 and LPS-treated DCs. After binding to its receptors NRP-1 and Glut-1, HTLV-1 enters using the transduction pathway characteristic of macropinocytosis, that is common in IL-4 and LPS-treated DCs. Specific drugs are shown on the right side of the first arrow. Neutral pH of macropinosomes from immature DCs is indicated in light grey, while acidic pH from mature DCs is indicated in dark grey. The presence of CD82 is indicated below each macropinosome. (B) Entry through clathrin-mediated endocytosis (CME) in IFN- $\alpha$  DCs. After binding to NRP-1 and Glut-1, HTLV-1 enters using clathrin and actin pathway. Specific drugs are shown on the right side of the arrow. The pH of vesicles is indicated by the grey color. See text for details.

## Supplementary Figure 1

**A**



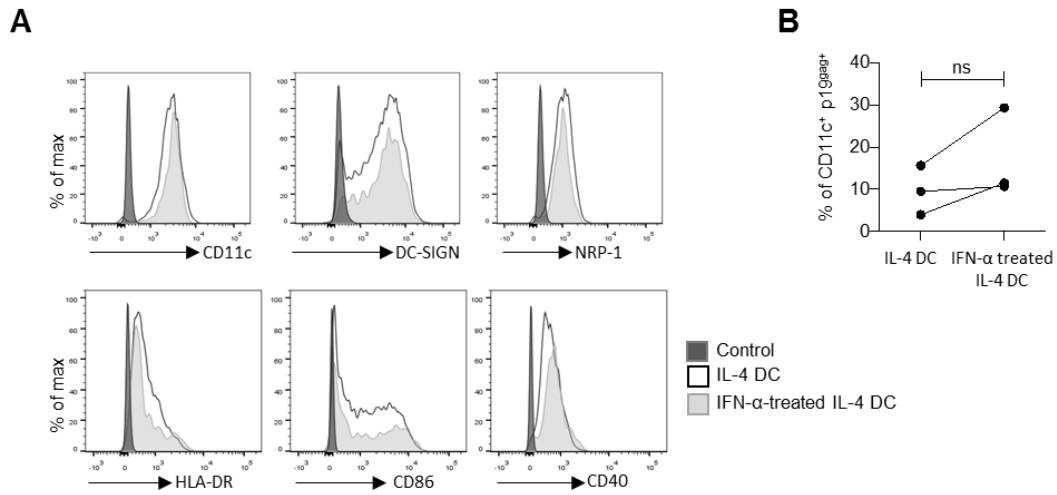
**B**



**Supplementary Figure 1: Surface markers in IL-4 DCs, TGF- $\beta$  DCs and IFN- $\alpha$  DCs.**

(A) Cells were labeled with fluorochrome-coupled antibodies (black lines) directed against CD11c, HLA-DR, CD83 and CD40. Unstained cells were used as negative controls (black graphs). (B) IL-4 DCs infection was determined by the number of Tax-expressing cells among IL-4 DCs in presence or absence of AZT. Results from 3 independent experiments obtained from different donors are presented. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using a paired t-test: \* $p < 0.05$ .

## Supplementary Figure 2

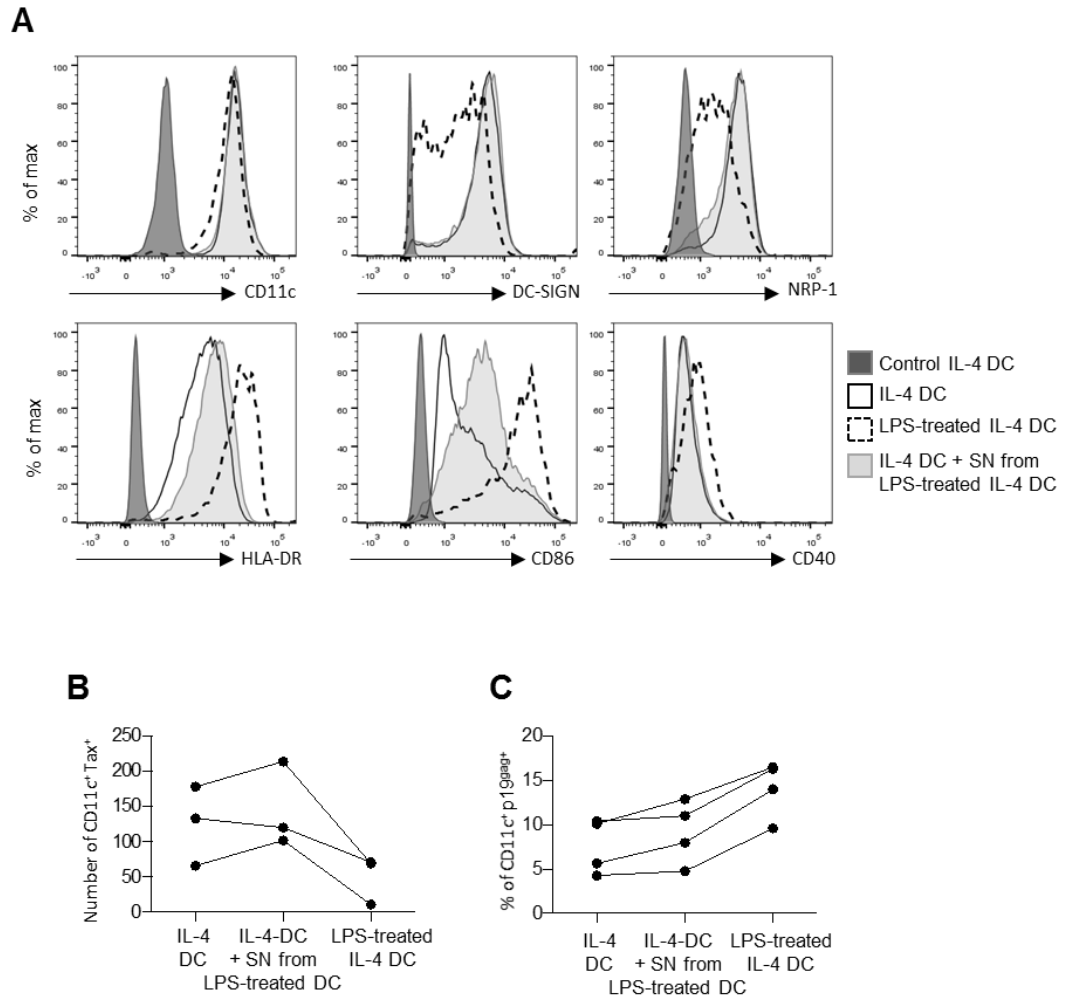


**Supplementary Figure 2: Recombinant IFN- $\alpha$  does not induce maturation of IL-4 DC and does not affect viral capture.**

(A) IL-4 DCs were cultured for 18 h in the presence of exogenous IFN- $\alpha$  (2000 IU/ml). Untreated (white histogram) and IFN- $\alpha$  treated IL-4 DCs (light grey histogram) were stained with antibodies directed against CD11c, DC-SIGN, NRP-1, HLA-DR, CD86 and CD40. Unstained cells were used as negative controls (black graphs). (B) Treated and untreated IL-4 DC from the same blood donor were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 h and the percentage of p19<sup>Gag</sup>-positive DCs was assessed by flow cytometry. Results are representative of 3 independent experiments performed on different donors. T-test was performed to assess statistically significant differences: ns = non significant.

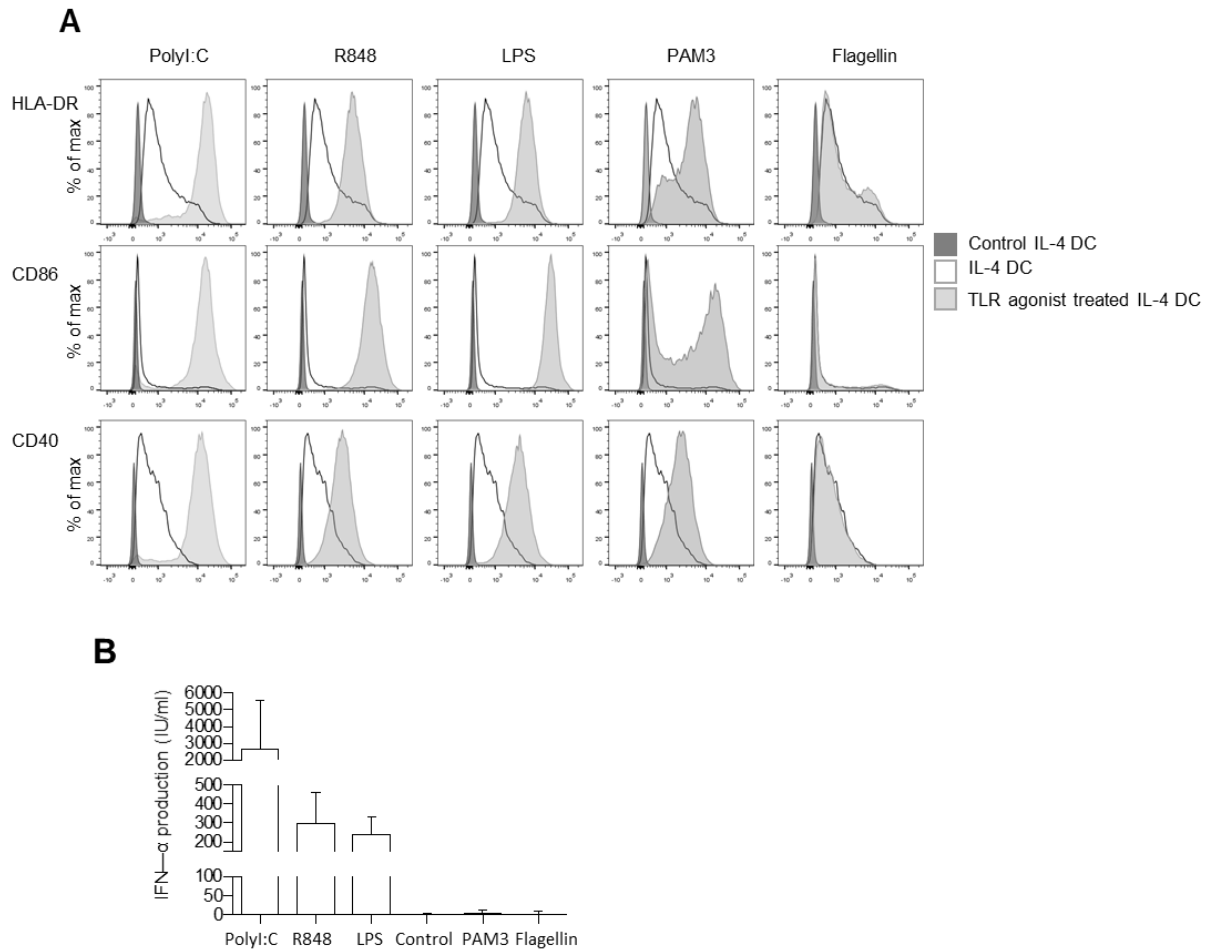


## Supplementary Figure 3



**Supplementary figure 3:** Treatment of IL-4 DCs with supernatant from LPS-matured DCs does not change IL-4 DC phenotype. (A) IL-4 DCs from same donor were cultured for 18 h with LPS (black dotted line) or with supernatant from LPS-matured DCs (light grey histogram) or left untreated as a control (black line). Cells were labeled with antibodies against CD11c, DC-SIGN, NRP-1, HLA-DR, CD86 and CD40. Unstained cells were used as negative controls (dark grey histogram). (B and C) IL-4 DCs, IL-4 DCs stimulated with supernatant from LPS-treated IL-4 DCs and LPS-treated IL-4 DCs from the same donor were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 h (C) or 3 days (B) and the number of Tax-positive DCs (B) or the percentage of p19<sup>Gag</sup>-positive DCs (C) were assessed by flow cytometry. DCs were discriminated from the C91-PL population by gating on CD11c expression. The results are shown as number of Tax-positive DCs (B) or as percentage of p19<sup>Gag</sup>-positive DCs (C).

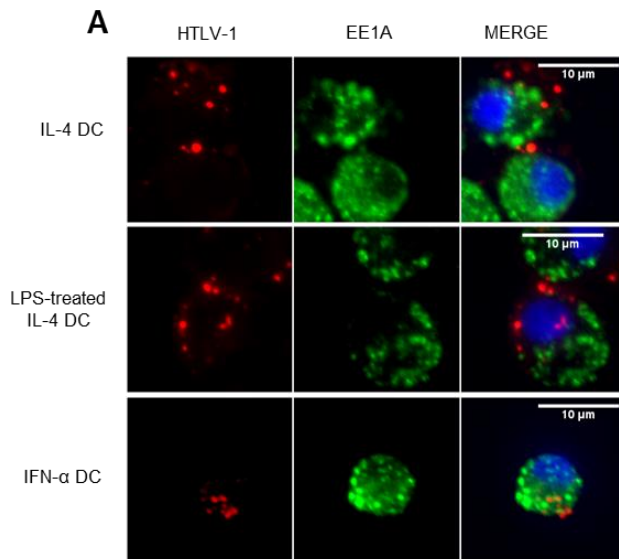
## Supplementary Figure 4



### **Supplementary figure 4: Phenotype of IL-4 DCs treated with TLR agonists.**

(A) IL-4 DCs were left untreated (white histogram) or were treated for 18 h with the TLR-3 ligand PolyI:C, the TLR-4 ligand LPS, the TLR-7/8 ligand R848, the TLR-2 ligand PAM3CSK4 or the TLR-5 ligand flagellin (light grey histogram). Cells were labeled with antibodies against HLA-DR, CD86 and CD40. Unstained cells were used as negative control (dark grey histogram). (B) Supernatant from untreated IL-4 DC or DC treated with the TLR agonists were collected after 18 h of culture and type I IFN levels measured using HL116 reporter cells expressing ISRE-Luc.

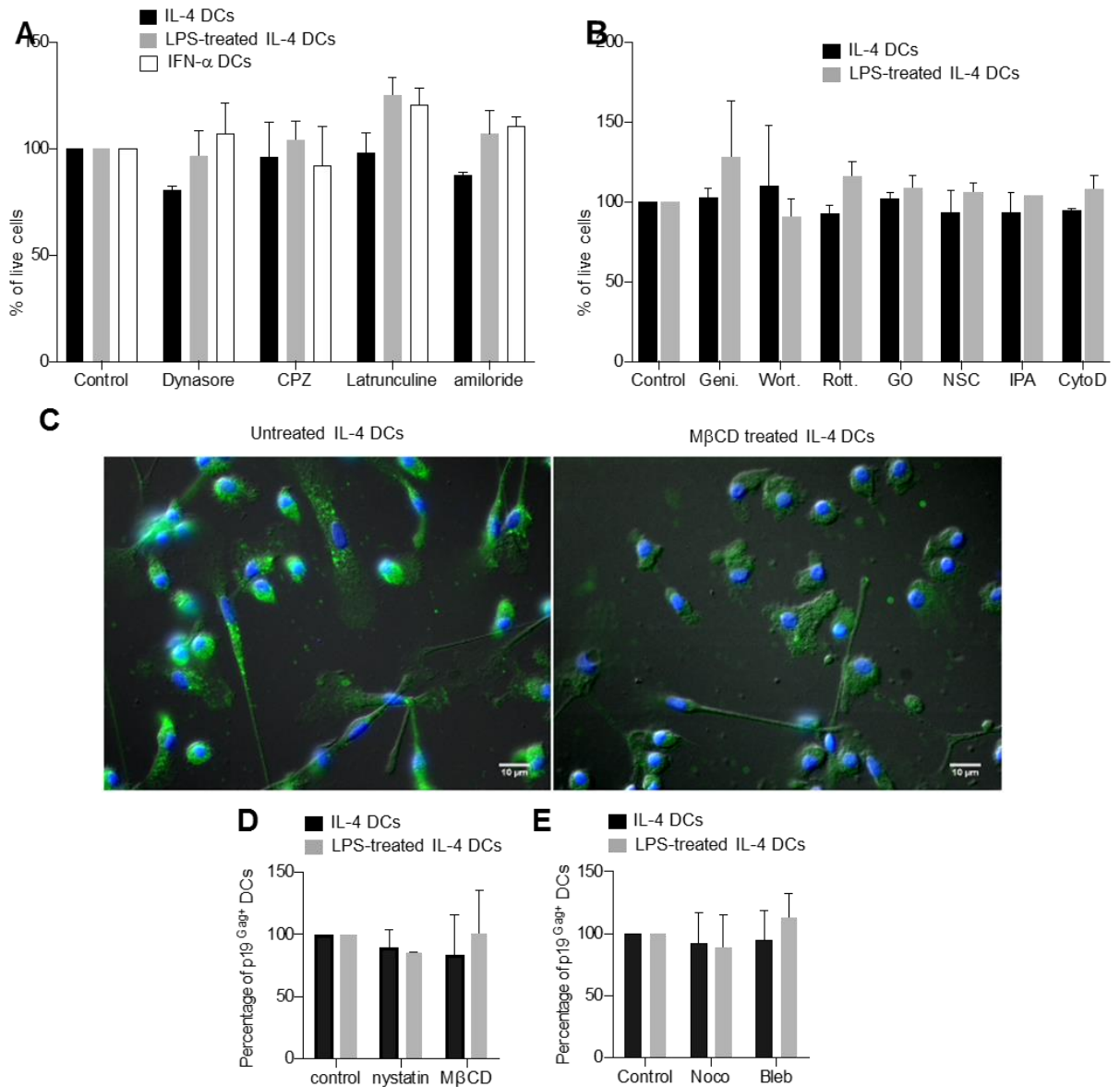
## Supplementary Figure 5



**Supplementary figure 5: HTLV-1 is not localized in EE1A<sup>+</sup> vesicles after capture by DCs.**

IL-4 DCs, LPS-treated IL-4 DCs and IFN- $\alpha$  DCs were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 h, and immunostained for p19<sup>Gag</sup> (red) and EE1A (green) before analysis by confocal microscopy. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Representative images obtained by confocal microscopy are shown. Scale bars = 10  $\mu$ m.

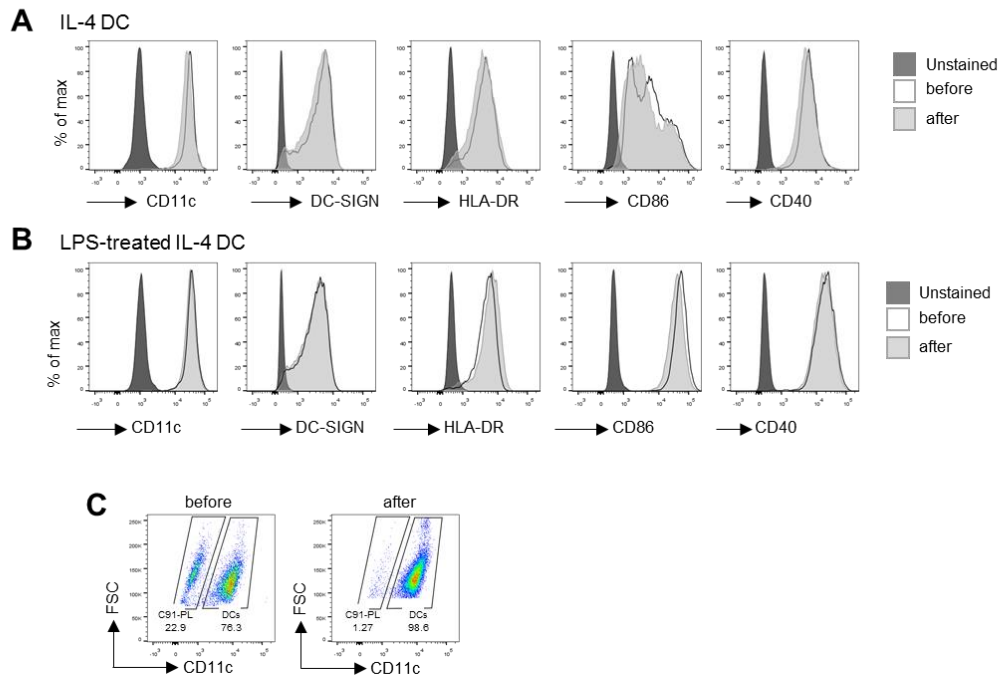
## Supplementary Figure 6



### Supplementary figure 6: Treatment with entry inhibitors does not affect cell viability.

IL-4 DCs (black bars), LPS treated IL-4 DCs (light gray bars) or IFN- $\alpha$  DCs (white bars) were treated for 3 h with (A) dynamin II inhibitors (dynasore, Dyna), clathrin-mediated endocytosis inhibitors (chlorpromazine, CPZ), actin polymerization inhibitors (latrunculin, lat) or macropinocytosis inhibitors (amiloride, ami) or (B) with constitutive macropinocytosis inhibitors (genistein, Gen), PI3K inhibitor (wortmanin, Wort), PKC inhibitors (rottlerin, Rott and Gö6976), Rac-1 inhibitors (NSC23766, NSC), Pak-1 inhibitor (IPA-3, IPA), and actin inhibitor (Cytochalasin D, Cyto D). Cell viability was monitored by FACS using live-dead staining. (C) IL-4 DCs were left untreated (left panel) or treated (right panel) for 3 h with methyl B cyclodextrine (M $\beta$ CD), fixed and incubated for 15 min with Nile red to stain lipid droplets (green). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Cells were visualized by fluorescence microscopy. (D-E) IL-4 DCs (black bars) or LPS treated IL-4 DCs (light gray bars) were treated for 3 h with nystatin or M $\beta$ CD to deplete cholesterol (D) or nocodazole (Noco) or blebstatin (bleb) to block microtubule polymerization (E). After treatment, DCs were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 h and viral capture determined by flow cytometry using p19<sup>Gag</sup> staining. DCs treated with DMSO were used as controls. The percentage of DCs positive for p19<sup>Gag</sup> was determined for each condition and normalized to that of the untreated control DCs. Results were obtained from 3 independent experiments performed with different blood donors.

## Supplementary Figure 7



**Supplementary figure 7: Phenotype of DCs and yield of C91-PL depletion after magnetic bead purification.**

(A) Untreated or (B) LPS-treated IL-4 DCs were exposed to C91-PL for 4 h, left untouched (before, white histograms) or magnetically isolated (after, light grey histograms) and labeled with antibodies against CD11c, DC-SIGN, HLA-DR, CD86 and CD40. Unstained cells were used as negative controls (dark grey histogram). (C) The yield of C91-PL depletion after magnetic isolation of IL-4 DCs was estimated by flow cytometry using anti-human CD11c staining. The percentage of C91-PL cells (CD11c negative population) and the percentage of DCs (CD11c positive population) are indicated on each plot before (left) and after (right) magnetic isolation of DCs.

## References

1. Gessain A, Cassar O (2012) Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol* 3: 388.
2. Bruhn R, Mahieux R, Murphy EL (In press) Human lymphotropic viruses: HTLV-1 and HTLV-2. : *Clinical Virology* 4th edition, ASM press.
3. Willems L, Hasegawa H, Accolla R, Bangham C, Bazarbachi A, et al. (2016) Reducing the global burden of HTLV-1 infection: An agenda for research and action. *Antiviral Res* 137: 41-48.
4. Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H (1977) Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* 50: 481-492.
5. Gessain A, Barin F, Vernant J, Gout O, Maurs L, et al. (1985) Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2: 407-410.
6. Ceccaldi P-EE, Delebecque F, Prevost M-CC, Moris A, Abastado J-PP, et al. (2006) DC-SIGN facilitates fusion of dendritic cells with human T-cell leukemia virus type 1-infected cells. *Journal of virology* 80: 4771-4780.
7. Jain P, Manuel SL, Khan ZK, Ahuja J, Quann K, et al. (2009) DC-SIGN mediates cell-free infection and transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 by dendritic cells. *J Virol* 83: 10908-10921.
8. Jones KS, Petrow-Sadowski C, Huang YK, Bertolette DC, Ruscetti FW (2008) Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nat Med* 14: 429-436.
9. Alais S, Mahieux R, Dutartre H (2015) Viral Source-Independent High Susceptibility of Dendritic Cells to Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection Compared to That of T Lymphocytes. *J Virol* 89: 10580-10590.
10. Dutartre H, Claviere M, Journo C, Mahieux R (2016) Cell-Free versus Cell-to-Cell Infection by Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Human T-Lymphotropic Virus Type 1: Exploring the Link among Viral Source, Viral Trafficking, and Viral Replication. *J Virol* 90: 7607-7617.
11. Hishizawa M, Imada K, Kitawaki T, Ueda M, Kadowaki N, et al. (2004) Depletion and impaired interferon-alpha-producing capacity of blood plasmacytoid dendritic cells in human T-cell leukaemia virus type I-infected individuals. *Br J Haematol* 125: 568-575.
12. Macatonia SE, Cruickshank JK, Rudge P, Knight SC (1992) Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8: 1699-1706.
13. Makino M, Wakamatsu S, Shimokubo S, Arima N, Baba M (2000) Production of functionally deficient dendritic cells from HTLV-I-infected monocytes: implications for the dendritic cell defect in adult T cell leukemia. *Virology* 274: 140-148.
14. Rahman S, Manuel SL, Khan ZK, Wigdahl B, Acheampong E, et al. (2010) Depletion of dendritic cells enhances susceptibility to cell-free infection of human T cell leukemia virus type 1 in CD11c-diphtheria toxin receptor transgenic mice. *J Immunol* 184: 5553-5561.
15. Valeri V, Hryniewicz A, Andresen V, Jones K, Fenizia C, et al. (2010) Requirement of the human T-cell leukemia virus p12 and p30 products for infectivity of human dendritic cells and macaques but not rabbits. *Blood* 116: 3809-3817.

16. Salvador A, Igartua M, Pedraz JL, Hernandez RM (2012) Dendritic cells interactions with the immune system - implications for vaccine development. *INTECH*.
17. Bangham CR, Ratner L (2015) How does HTLV-1 cause adult T-cell leukaemia/lymphoma (ATL)? *Curr Opin Virol* 14: 93-100.
18. Iwanaga M, Watanabe T, Yamaguchi K (2012) Adult T-cell leukemia: a review of epidemiological evidence. *Front Microbiol* 3: 322.
19. Banchereau R, Baldwin N, Cepika AM, Athale S, Xue Y, et al. (2014) Transcriptional specialization of human dendritic cell subsets in response to microbial vaccines. *Nat Commun* 5: 5283.
20. Tanaka Y, Yoshida A, Takayama Y, Tsujimoto H, Tsujimoto A, et al. (1990) Heterogeneity of antigen molecules recognized by anti-tax1 monoclonal antibody Lt-4 in cell lines bearing human T cell leukemia virus type I and related retroviruses. *Jpn J Cancer Res* 81: 225-231.
21. Pais-Correia AM, Sachse M, Guadagnini S, Robbiati V, Lasserre R, et al. (2010) Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat Med* 16: 83-89.
22. Uze G, Di Marco S, Mouchel-Vielh E, Monneron D, Bandu MT, et al. (1994) Domains of interaction between alpha interferon and its receptor components. *J Mol Biol* 243: 245-257.
23. Cachat A, Chevalier SA, Alais S, Ko NL, Ratner L, et al. (2013) Alpha interferon restricts human T-lymphotropic virus type 1 and 2 de novo infection through PKR activation. *J Virol* 87: 13386-13396.
24. Chevalier SA, Turpin J, Cachat A, Afonso PV, Gessain A, et al. (2014) Gem-induced cytoskeleton remodeling increases cellular migration of HTLV-1-infected cells, formation of infected-to-target T-cell conjugates and viral transmission. *PLoS Pathog* 10: e1003917.
25. Lambert S, Bouttier M, Vassy R, Seigneuret M, Cari P-S, et al. (2009) HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. *Blood* 113: 5176-5185.
26. Jia X, Zhao Q, Xiong Y (2015) HIV suppression by host restriction factors and viral immune evasion. *Curr Opin Struct Biol* 31: 106-114.
27. Kinpara S, Kijiyama M, Takamori A, Hasegawa A, Sasada A, et al. (2013) Interferon-alpha (IFN-alpha) suppresses HTLV-1 gene expression and cell cycling, while IFN-alpha combined with zidovudine induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-1-infected cells. *Retrovirology* 10: 52.
28. Harper MS, Guo K, Gibbert K, Lee EJ, Dillon SM, et al. (2015) Interferon-alpha Subtypes in an Ex Vivo Model of Acute HIV-1 Infection: Expression, Potency and Effector Mechanisms. *PLoS Pathog* 11: e1005254.
29. Kerr MC, Teasdale RD (2009) Defining macropinocytosis. *Traffic* 10: 364-371.
30. Alloatti A, Kotsias F, Magalhaes JG, Amigorena S (2016) Dendritic cell maturation and cross-presentation: timing matters! *Immunol Rev* 272: 97-108.
31. Kijewski SD, Gummuluru S (2015) A mechanistic overview of dendritic cell-mediated HIV-1 trans infection: the story so far. *Future Virol* 10: 257-269.
32. Sewald X, Ladinsky MS, Uchil PD, Beloor J, Pi R, et al. (2015) Retroviruses use CD169-mediated trans-infection of permissive lymphocytes to establish infection. *Science* 350: 563-567.

33. Macatonia S, Cruickshank J, Rudge P, Knight S (1992) Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS research and human retroviruses* 8: 1699-1706.
34. van Boxel-Dezaire AH, Rani MR, Stark GR (2006) Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity* 25: 361-372.
35. van Boxel-Dezaire AH, Zula JA, Xu Y, Ransohoff RM, Jacobberger JW, et al. (2010) Major differences in the responses of primary human leukocyte subsets to IFN-beta. *J Immunol* 185: 5888-5899.
36. Hilkens CM, Schlaak JF, Kerr IM (2003) Differential responses to IFN-alpha subtypes in human T cells and dendritic cells. *J Immunol* 171: 5255-5263.
37. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, et al. (2011) A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472: 481-485.
38. Cachat A, Alais S, Chevalier SA, Journo C, Fusil F, et al. (2014) ADAR1 enhances HTLV-1 and HTLV-2 replication through inhibition of PKR activity. *Retrovirology* 11: 93.
39. Pique C, Lagaudrière-Gesbert C, Delamarre L, Rosenberg AR, Conjeaud H, et al. (2000) Interaction of CD82 Tetraspanin Proteins with HTLV-1 Envelope Glycoproteins Inhibits Cell-to-Cell Fusion and Virus Transmission. *Virology* 276: 455-465.
40. Li K, Zhang S, Kronqvist M, Wallin M, Ekstrom M, et al. (2008) Intersubunit disulfide isomerization controls membrane fusion of human T-cell leukemia virus Env. *J Virol* 82: 7135-7143.
41. Bosch B, Grigorov B, Senserrich J, Clotet B, Darlix JL, et al. (2008) A clathrin-dynamamin-dependent endocytic pathway for the uptake of HIV-1 by direct T cell-T cell transmission. *Antiviral Res* 80: 185-193.
42. Hubner W, McNerney GP, Chen P, Dale BM, Gordon RE, et al. (2009) Quantitative 3D video microscopy of HIV transfer across T cell virological synapses. *Science* 323: 1743-1747.
43. Sloan RD, Kuhl BD, Mesplede T, Munch J, Donahue DA, et al. (2013) Productive entry of HIV-1 during cell-to-cell transmission via dynamamin-dependent endocytosis. *J Virol* 87: 8110-8123.
44. Dale BM, McNerney GP, Thompson DL, Hubner W, de Los Reyes K, et al. (2011) Cell-to-cell transfer of HIV-1 via virological synapses leads to endosomal virion maturation that activates viral membrane fusion. *Cell Host Microbe* 10: 551-562.
45. Zhang X, Meng Z, Qiu S, Xu Y, Yang D, et al. (2009) Lipopolysaccharide-induced innate immune responses in primary hepatocytes downregulates woodchuck hepatitis virus replication via interferon-independent pathways. *Cell Microbiol* 11: 1624-1637.
46. Platt CD, Ma JK, Chalouni C, Ebersold M, Bou-Reslan H, et al. (2010) Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 4287-4292.
47. Canton J, Schlam D, Breuer C, Gutschow M, Glogauer M, et al. (2016) Calcium-sensing receptors signal constitutive macropinocytosis and facilitate the uptake of NOD2 ligands in macrophages. *Nat Commun* 7: 11284.
48. Raposo G, Moore M, Innes D, Leijendekker R, Leigh-Brown A, et al. (2002) Human Macrophages Accumulate HIV-1 Particles in MHC II Compartments. *Traffic*.
49. Jouve M, Sol-Foulon N, Watson S, Schwartz O, Benaroch P (2007) HIV-1 Buds and Accumulates in "Nonacidic" Endosomes of Macrophages. *Cell Host & Microbe* 2: 85-95.



50. Gaudin R, Berre S, Cunha de Alencar B, Decalf J, Schindler M, et al. (2013) Dynamics of HIV-containing compartments in macrophages reveal sequestration of virions and transient surface connections. *PLoS One* 8: e69450.
51. Benaroch P, Billard E, Gaudin R, Schindler M, Jouve M (2010) HIV-1 assembly in macrophages. *Retrovirology* 7: 29.
52. Pelchen-Matthews A, Kramer B, Marsh M (2003) Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol* 162: 443-455.
53. Welsch S, Groot F, Krausslich HG, Keppler OT, Sattentau QJ (2011) Architecture and regulation of the HIV-1 assembly and holding compartment in macrophages. *J Virol* 85: 7922-7927.
54. Kramer B, Pelchen-Matthews A, Deneka M, Garcia E, Piguet V, et al. (2005) HIV interaction with endosomes in macrophages and dendritic cells. *Blood Cells Mol Dis* 35: 136-142.
55. Finzi A, Brunet A, Xiao Y, Thibodeau J, Cohen EA (2006) Major histocompatibility complex class II molecules promote human immunodeficiency virus type 1 assembly and budding to late endosomal/multivesicular body compartments. *Journal of virology* 80: 9789-9797.
56. Finzi A, Perlman M, Bourgeois-Daigneault MC, Thibodeau J, Cohen EA (2013) Major histocompatibility complex class-II molecules promote targeting of human immunodeficiency virus type 1 virions in late endosomes by enhancing internalization of nascent particles from the plasma membrane. *Cell Microbiol* 15: 809-822.
57. van Montfoort N, Olganier D, Hiscott J (2014) Unmasking immune sensing of retroviruses: interplay between innate sensors and host effectors. *Cytokine Growth Factor Rev* 25: 657-668.
58. Barroca P, Calado M, Azevedo-Pereira JM (2014) HIV/dendritic cell interaction: consequences in the pathogenesis of HIV infection. *AIDS Rev* 16: 223-235.
59. Izquierdo-Useros N, Blanco J, Erkizia I, Fernandez-Figueras MT, Borrás FE, et al. (2007) Maturation of blood-derived dendritic cells enhances human immunodeficiency virus type 1 capture and transmission. *J Virol* 81: 7559-7570.
60. Cote SC, Plante A, Tardif MR, Tremblay MJ (2013) Dectin-1/TLR2 and NOD2 agonists render dendritic cells susceptible to infection by X4-using HIV-1 and promote cis-infection of CD4(+) T cells. *PLoS One* 8: e67735.
61. Rahman S, Khan ZK, Wigdahl B, Jennings SR, Tangy F, et al. (2011) Murine FLT3 ligand-derived dendritic cell-mediated early immune responses are critical to controlling cell-free human T cell leukemia virus type 1 infection. *J Immunol* 186: 390-402.

## 4 Discussion

Ce travail démontre l'existence d'une différence de susceptibilité à l'infection productive par HTLV-1 entre les sous-types de MDDCs en coculture avec les cellules C91-PL. En effet, seules les MDDCs immatures (IL-4 DCs) et tolérogènes (TGF- $\beta$  DCs) sont susceptibles à l'infection productive alors que les MDDCs matures (IFN- $\alpha$  DCs et IL-4 DCs maturés au LPS) restreignent l'infection productive. Similairement, lors de l'infection par VIH-1, seules les MDDCs immatures sont permissives à l'infection alors que les MDDCs matures restreignent l'infection productive (Dong et al., 2007). Comme la lectine DC-SIGN est sous-réglée lors de la maturation des MDDCs et au niveau des IFN- $\alpha$  DCs et des IL-4 DCs maturés au LPS, nous pourrions suggérer que la susceptibilité à l'infection productive des MDDCs serait dépendante du niveau d'expression de DC-SIGN. Pour cela, je discuterai du rôle de DC-SIGN dans l'induction de la susceptibilité ou de la restriction à l'infection productive.

Nous avons aussi constaté qu'il existe une corrélation inverse entre la capture virale à 3 heures de coculture et l'infection productive à 3 jours de coculture entre HTLV-1 et DCs : une population d'IL-4 DCs qui exprime sensiblement moins de p19<sup>Gag</sup> après 3 heures de coculture avec les cellules C91-PL en comparaison aux MDDCs matures, s'infecte productivement et exprime davantage la protéine Tax, après trois jours de coculture avec les cellules C91-PL en comparaison aux MDDCs matures et inversement. Dans ce qui suit, je discuterai comment la cinétique de sortie des virus des endosomes peut expliquer cette observation.

Ensuite, à travers les expériences de microscopie confocale, nous avons conclu qu'HTLV-1, à l'instar de nombreux virus, se retrouverait dans des compartiments non conventionnels 3 heures après sa capture au niveau des différents sous-types de MDDCs. Ceci lui permettrait d'échapper à la dégradation dans les lysosomes. De plus, nous avons montré que le pH de ces compartiments varie d'un sous-type de MDDCs à l'autre : en effet, lorsqu'une DC est immature (IL-4 DCs), le pH de ce compartiment est moins acide en comparaison au pH des compartiments des DCs matures (IL-4 DCs maturées au LPS, IFN- $\alpha$  DCs). Du fait que les MDDCs immatures s'infectent productivement au contraire des MDDCs matures, nous pourrions suggérer que le pH acide des compartiments des MDDCs matures dégraderait la particule virale ce qui restreindrait l'infection

productive. Plusieurs résultats de mon étude pourraient confirmer, ici, cette hypothèse : tout d'abord, le fait que les MDDCs matures (IL-4 DCs maturées au LPS et IFN- $\alpha$  DCs) transmettent sensiblement moins HTLV-1 aux lymphocytes T via la trans-infection suggèrerait qu'HTLV-1 serait dégradé lors de son passage dans les endosomes. Ensuite, le fait que le traitement des MDDCs matures à la chloroquine permette un rétablissement, quoique partiel, de l'infection productive, appuie aussi cette hypothèse. Dans ce cas, la neutralisation des compartiments des MDDCs matures conduirait à une moindre dégradation d'HTLV-1 et donc, au final à une restauration partielle de l'infection productive au niveau des MDDCs matures. Néanmoins, l'absence de restauration totale de l'infection productive au niveau des DCs matures suggère l'induction de facteurs de restriction à l'infection par HTLV-1 lors de la maturation. De plus, que nous soyons au niveau des IL-4 DCs ou au niveau des DCs matures, les taux d'infection productive sont dans l'ensemble bas : ils culminent à 0.57 % pour les IL-4 DCs et à 0.19 % et 0.12% pour les IL-4 DCs traités au LPS et les IFN- $\alpha$  DCs respectivement. Dans ce qui suit, je discuterai des facteurs de restriction à l'infection par HTLV-1 au niveau des DCs, en général et, plus spécifiquement au niveau des DCs matures.

Mes expériences ont enfin prouvé qu'il existe un échappement des DCs à l'action anti-virale de l'IFN- $\alpha$  : les IL-4 DCs pré-traités à l'IFN- $\alpha$ 2a restent susceptibles à l'infection productive. Au contraire, dans notre laboratoire, Anne Cachat avait prouvé que l'IFN- $\alpha$ 2a inhibait l'infection des lymphocytes T à travers l'activation de PKR (Cachat et al., 2013). Je discuterai ici des raisons sous-jacentes à ces différences de susceptibilité entre lymphocytes T et DCs à l'action de l'IFN- $\alpha$ 2a lors de l'infection par HTLV-1.

Enfin, avant d'aborder tous ces différents aspects, je débiterai cette discussion à travers une réflexion sur les limites du modèle d'étude : les MDDCs.

#### 4-1 Les MDDCs *in vitro* sont-elles représentatives de la diversité des DCs *in vivo* ?

Les résultats significatifs que nous avons obtenus *in vitro* à travers la comparaison de la capacité de trois MDDCs différemment maturées à s'infecter productivement et à transmettre HTLV-1 aux lymphocytes T ne tiennent pas compte de la diversité et de la plasticité des sous-types des DCs *in vivo*. En effet, les profils transcriptomiques des DCs CD1c+ et des DCs CD141+ que nous mimons, dans notre étude, par les IL-4 DCs, diffèrent lorsque ces deux sous-types sont exposés à un même

vaccin, *in vitro* (Banchereau et al., 2014). Ceci suggère que, *in vivo*, des DCs CD1c+ et des DCs CD141+ sont différemment spécialisées en réponse à un pathogène et qu'il serait imprécis de les résumer par les IL-4 DCs, *in vitro*. Dans ce contexte, Moghaddami s'est demandé s'il est possible de remplacer, au cours des études, *in vitro*, les DCs isolées du fluide synovial (SFDCs) par des MDDCs (Moghaddami et al., 2014). Pour répondre à cette question, Moghaddami a comparé les MDDCs aux SFDCs tant au niveau de la morphologie, qu'au niveau du phénotype ainsi qu'au niveau des réponses de chacun de ces deux sous-types de DCs au LPS et au 1,25 dihydroxy-cholecalciferol. Ses résultats ont montré que les SFDCs et les MDDCs sont similaires au niveau de leur morphologie cellulaire et de l'expression des cytokines après stimulation au 1,25 hydroxy-cholecalciferol. Néanmoins, les SFDCs et les MDDCs diffèrent dans leur expression des prostaglandines D-synthase, PGDS, à un niveau basal. Ici, l'expression des PGDSs par les SFDCs et non par les MDDCs pourrait moduler les réponses immunes dans le fluide synovial à travers des effets autocrines et paracrines. De plus, les SFDCs répondent aussi davantage au LPS que les MDDCs en produisant plus de cytokines (IL-23, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) (Moghaddami et al., 2014).

Pour cela, en tenant compte des conclusions des résultats de Banchereau et de Moghaddami, il semblerait important de valider nos résultats avec des DCs purifiées *ex vivo* à partir de tissus. Néanmoins, les études sur des DCs purifiées, *ex vivo*, présentent de nombreuses difficultés. Tout d'abord, les DCs sont rares au niveau du sang et de la peau : au niveau du sang, les DCs ne représentent que 1% des cellules mononuclées. De même, une surface de peau de 1.8 m<sup>2</sup> ne renfermerait que 10 fois plus de DCs en comparaison avec la quantité de DCs retrouvée, en moyenne, dans 5 litres de sang (Gunawan et al., 2016). Ensuite, lors de l'isolement des DCs de la peau à la suite de leur migration à partir des biopsies (pour protocoles (Gunawan et al., 2016)), les DCs se retrouvent souvent contaminées par les macrophages de la peau. D'où la nécessité de séparer, ensuite, les DCs des macrophages à travers la fonction de tri par cytométrie de flux (Gunawan et al., 2016) et de reconstrôler la pureté des DCs purifiées. La purification magnétique des DCs isolées *ex vivo* peut être une alternative à la cytométrie de flux. Néanmoins, en raison de la fragilité des DCs qui sont ici exposés à des conditions de stress mécanique, la purification magnétique ne conduit pas à des rendements de DCs purifiées élevés (Sato et al., 2016). Enfin, la purification magnétique ne permet pas de contourner la présence des contaminants cellulaires avec les DCs. Dans ce contexte, Schröder met en garde contre les interprétations des résultats d'études obtenus à la suite de la purification des DCs par le kit CD1c (BDCA-1)+. En effet, ce kit permet

d'isoler, simultanément, deux populations cellulaires différentes : les DCs CD1c+ CD14- et les monocytes CD1c+ CD14+. Les différences entre ces deux populations ne se résument pas à l'expression des marqueurs de surface. Elles incluent également la production de cytokines et la capacité à stimuler les lymphocytes T naïfs (Schrøder et al., 2016). En conclusion, ce sont toutes ces considérations qui justifient l'usage des MDDCs, au niveau de notre étude.

#### 4-2 L' Absence de modèle animal : une limite de mon étude

Les études *in vivo* sur de petits animaux (rat, lapin, souris) ou sur de grands animaux (singe) permettent de comprendre la transmission, la dissémination et la persistance de l'infection (pour revue (Pérès et al., 2015) et (Cachat et al., 2012)). La souris humanisée est le modèle le plus fréquemment utilisé pour l'étude des maladies infectieuses humaines. C'est la greffe de cellules progénitrices ou des tissus humains chez des souris immunodéficientes qui a permis de générer les souris humanisées. Par exemple, les souris NOD/SCID (immunodéficiences sévères avec absence de complément, de DCs et de macrophages fonctionnels) implantées avec un thymus et des tissus du foie foétaux humains puis avec des cellules souches hématopoïétiques humaines autologues au foie foétal sont repeuplées, plusieurs semaines à la suite de cette intervention, avec des lymphocytes T et B humains, des monocytes, des macrophages et DCs (Melkus et al., 2006). Récemment de nouvelles technologies (CRISPR/Cas9) ont été déployées pour manipuler le génome de la souris à travers, par exemple, l'ajout de gènes qui codent pour des cytokines humaines ou pour l'expression transgénique de molécules du CMH (Zhou et al., 2014) et (Shultz et al., 2010). Les souris humanisées peuvent nous être utiles pour confirmer *in vivo* ou *ex vivo* nos résultats sur un modèle animal, en l'absence d'accès à des prélèvements humains. Dans notre cas, infecter des souris humanisées par voie intraveineuse, par voie digestive ou par voie muco-sale avec HTLV-1 permettrait de reproduire respectivement la primo-infection au niveau des voies d'entrée horizontale, verticale et sexuelle, respectivement. Nous pourrions alors vérifier que l'infection des DCs par HTLV-1 précède l'infection des lymphocytes T et que seules les DCs immatures sont susceptibles de s'infecter et de transmettre HTLV-1. Aussi, l'utilisation des souris humanisées permettrait de préciser et de comparer les mécanismes moléculaires et cellulaires de la restriction à l'infection entre les MDDCs *in vitro* et les populations de DCs isolées *in vivo*.

#### 4-3 Par quel(s) mécanisme(s) la sur-expression de DC-SIGN au niveau des IL-4 DCs peut-est-elle être impliquée dans l'infection productive ?

C'est au niveau des IL-4 DCs qui expriment le plus DC-SIGN par comparaison aux autres sous-types de DCs que nous retrouvons le taux le plus important d'infection productive. Au contraire, les TGF- $\beta$  DCs, IL-4 DCs maturées au LPS et IFN- $\alpha$  DCs expriment moins DC-SIGN par comparaison aux IL-4 DCs et sont moins susceptibles à l'infection productive par HTLV-1. C'est pour cela qu'il est légitime de se demander en quoi la signalisation à travers DC-SIGN peut favoriser l'infection productive des IL-4 DCs par HTLV-1.

L'expression de DC-SIGN facilite, tout d'abord, la capture de nombreux virus par les DCs. C'est le cas du virus de la dengue (Lozach et al., 2005), du VIH-1 (Nobile et al., 2003), Ebola (Simmons et al., 2003), Marburg et Coronavirus (Marzi et al., 2004).

Ensuite, l'interaction virus-DC-SIGN conditionnerait l'adressage viral dans la DC. A ce niveau, ce sont les deux motifs de DC-SIGN, le motif LL (une dileucine) et le cluster tri-acidique EEE (Svajger et al., 2010) qui sont impliqués dans le trafic intra-cellulaire. D'ailleurs, Lozach a montré que la mutation du motif LL empêche la capture et l'endocytose des phlebovirus (Lozach et al., 2011b). De plus, DC-SIGN peut bloquer l'adressage des endosomes vers l'autophagie. Par exemple, lorsque la capture de *P. gingivalis* se fait via DC-SIGN, *P. gingivalis* se concentre en dehors des compartiments intercellulaires de l'autophagie. Au contraire, lorsque la capture de *P. gingivalis* se fait à travers une voie indépendante de DC-SIGN, *P. gingivalis* est internalisé dans des phagosomes précoces puis dans des phagophores, deux structures de la macroautophagie (El-Awady et al., 2015). Dans le même contexte, Ribeiro a montré que lorsque VIH-1 est lié à la langérine au niveau des LCs (DC-SIGN- LCs), TRIM5 $\alpha$  adresse VIH-1 vers une dégradation par l'autophagie. L'inhibition de l'infection productive des LCs en résulte. Au contraire, l'inhibition de l'autophagie à travers l'extinction d'*Atg5* ou de l'*Atg16L1* (deux gènes de l'autophagie) résulte en l'augmentation de l'intégration de VIH-1 et en l'infection des LCs. Au contraire, lorsque la liaison de VIH-1 se fait sur des DCs DC-SIGN+, la dissociation de TRIM5 $\alpha$  de DC-SIGN a lieu. Ceci a pour conséquences de lever la restriction qu'exerce TRIM5 $\alpha$  et de permettre l'infection productive des DCs DC-SIGN+ (Ribeiro et al., 2016). La figure 2 illustre les résultats de Ribeiro. Similairement, les résultats de Lozach montrent que les MDDCs exprimant DC-SIGN sont

infectées par le virus de la dengue au contraire des LCs qui n'expriment pas DC-SIGN (Lozach et al., 2005).

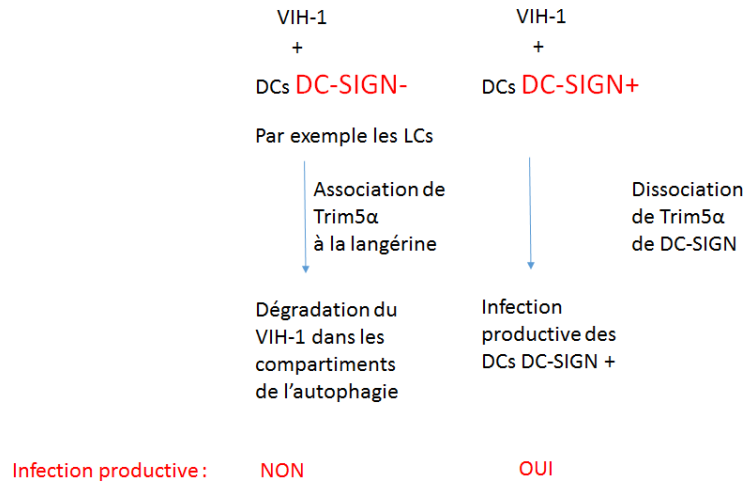


Figure 2 : Contribution de TRIM5α à l'infection productive ou à la restriction au niveau des DCs DC-SIGN+ et des DCs DC-SIGN-. D'après les travaux de (Ribeiro et al., 2016)

Enfin, c'est à travers un mécanisme d'échappement aux réponses antivirales cellulaires que DC-SIGN permet à l'infection productive par les rétrovirus d'avoir lieu dans les MDDCs. Cet échappement se fait à travers l'activation de Raf-1, une kinase, qui inhibe l'activité des phosphatases PP1. Cette inhibition des phosphatases PP1 résulte en la diminution de l'activation des RIG-I-like receptors (RIG-I), des détecteurs cytosoliques de l'ARNm (Geijtenbeek et al., 2009). C'est par ce mécanisme que DC-SIGN prévient la maturation des DCs et contribue, par exemple, à l'augmentation de la réplication du virus de la rougeole (Mesman et al., 2014). Au contraire, la neutralisation de DC-SIGN avant l'exposition des DCs myéloïdes ou des pDCs au virus respiratoire syncytial (VRS) conduit à une augmentation de la maturation ainsi qu'à la production de cytokines par ces deux sous-types de DCs (IFN-α, IL-6, IL-8, MIP-1α, MIP-1β) (Johnson et al., 2012). Ce mécanisme permettrait à DC-SIGN d'être impliqué dans l'infection productive des DCs par de nombreux virus : HTLV-1 (Jain et al., 2009), l'influenza de type A (Hillaire et al., 2013), la dengue (Lozach et al., 2005), le VIH-1 (Nobile et al., 2003)

Au niveau de mes résultats, les IFN- $\alpha$  DCs représenteraient les DCs DC-SIGN-. Au contraire, les IL-4 DCs représenteraient les DCs DC-SIGN+. En corrélation avec les résultats de Ribeiro, je peux suggérer que DC-SIGN permettrait un adressage différent d'HTLV-1 dans les IL-4 DCs en comparaison aux IFN- $\alpha$  DCs. Ensuite, DC-SIGN préviendrait la maturation des IL-4 DCs ce qui leur permettrait de s'infecter productivement. D'ailleurs, à travers mes expériences, je constate que les DCs DC-SIGN+ Tax+ n'expriment jamais les marqueurs de maturation. Ainsi, les DCs au niveau desquelles DC-SIGN est engagé pourraient constituer une niche protectrice pour la persistance des pathogènes à travers deux mécanismes médiés par DC-SIGN : une évasion à l'immunité qui permet l'infection productive et aussi une évasion à l'autophagie et aux facteurs de restrictions à travers un adressage particulier, comme le suggèrent les exemples de VIH-1 et de *Porphyromonas gingivalis*. En conclusion, pour confirmer l'hypothèse de l'implication de la sous-régulation de DC-SIGN dans l'adressage d'HTLV-1 aux compartiments de l'autophagie, je propose d'inhiber l'autophagie dans les sous-types de DCs qui sous-régulent DC-SIGN et qui restreignent l'infection (IL-4 DCs maturés au LPS, au PolyIC, au R848 et IFN- $\alpha$  DCs) avant d'évaluer le degré de restauration de l'infection productive. Ici, la restauration partielle de l'infection productive à la suite d'un pré-traitement pendant 3 heures de temps des IL-4 DCs maturées au LPS et des IFN- $\alpha$  DCs par la choroquine, inhibiteur de l'autophagie est un premier résultat prometteur. De plus, afin de confirmer le rôle de DC-SIGN au cours de l'infection productive des DCs immatures lors d'une transmission inter-cellulaire d'HTLV-1, je propose d'inhiber DC-SIGN au niveau des IL-4 DCs et des TGF- $\beta$  DCs et de suivre l'évolution de l'infection productive à la suite de la coculture de ces cellules avec la lignée cellulaire C91-PL.

#### 4-4 Un modèle dynamique pour comprendre la corrélation inverse entre capture et infection productive ?

Les résultats de mon étude montrent que, en moyenne 7%, 14% et 35% des IL-4 DCs, IL-4 DCs maturés au LPS et IFN- $\alpha$  DCs capturent respectivement HTLV-1 après coculture pendant trois heures avec les cellules chroniquement infectées C91-PL. Cependant, seules 0.57 %, 0.19 % et 0.12% de ces DCs s'infectent, en moyenne, productivement. Ainsi, les IL-4 DCs immatures capturent moins HTLV-1 que les 2 autres sous-types. En revanche, la probabilité que la capture



dans les IL-4 DCs aboutisse à une infection productive est plus élevée. Cette constatation nous emmène à nous poser ces questions :

- Pourquoi les IL-4 DCs capturent moins HTLV-1 en comparaison aux autres sous-types ?
- A quoi est due la restriction au niveau des sous-types matures de DCs ?

#### 4-4-1 Pourquoi les IL-4 DCs capturent moins HTLV-1 par comparaison aux MDDCs matures ?

Le fait que la population des IL-4 DCs capture moins HTLV-1 par comparaison aux autres sous-types de DCs est surprenant dans la mesure où les IL-4 DC sur-expriment les récepteurs d'HTLV-1 (DC-SIGN et NRP-1) en comparaison aux IFN- $\alpha$  DCs et aux IL-4 DCs maturés au LPS.

Dans le cadre de mes expériences, nous avons mis en évidence qu'après trois heures de culture avec respectivement les trois sous-types de MDDCs, HTLV-1 ne co-localise pas avec EEA1, un marqueur des endosomes précoces. Pour cela, nous avons suggéré puis vérifié qu'HTLV-1 pouvait se trouver au niveau des corps multi-vésiculaires CD82+.

En premier, en raison du pH proche de la neutralité du compartiment CD82+ des IL-4 DCs, l'enveloppe d'HTLV-1 pourrait fusionner à la membrane du compartiment CD82+, ce qui permettrait la libération de la capsid renfermant le matériel génétique dans le cytosol. Après une rétro-transcription, l'ADN du provirus pourrait intégrer le génome de la DC et donner lieu à une infection productive. On peut supposer que la cinétique de sortie du virus des endosomes dans les DCs immatures est rapide. De plus, elle limiterait son accumulation dans les endosomes, réduisant ainsi le nombre de DCs ayant capturé le virus.

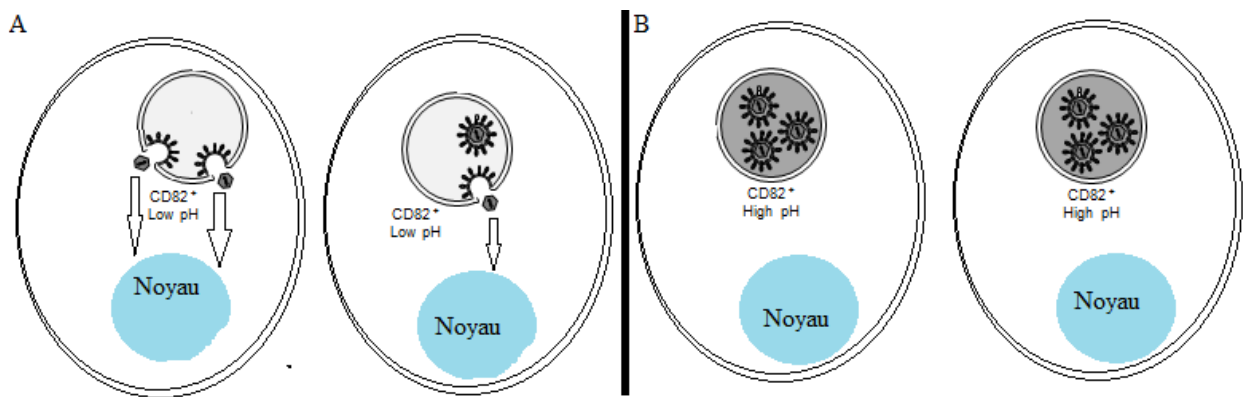
Au contraire, le pH acide des compartiments des IL-4 DCs maturés au LPS et des IFN- $\alpha$  DCs pourrait dénaturer les molécules d'enveloppe, empêchant ainsi la fusion et donc la sortie des endosomes. C'est ce qui expliquerait la raison pour laquelle nous notons un pourcentage élevé d'IFN- $\alpha$  DCs ou d'IL-4 DCs traités au LPS qui accumulent de manière significative HTLV-1 à trois heures de coculture en comparaison à l'accumulation d'HTLV-1 au niveau de la population des IL-4 DCs. C'est la raison pour laquelle les IFN- $\alpha$  DCs ou des IL-4 DCs traitées au LPS donnent faiblement lieu à une infection productive. Plusieurs arguments appuieraient ici cette hypothèse. Le premier est l'absence d'intégration provirale au niveau de ces deux sous-types de DCs matures au contraire des IL-4 DCs. Le second argument se retrouve dans les résultats significativement réduits de la transmission virale aux lymphocytes T : la transmission d'HTLV-1, 48 heures après sa

capture par les DCs matures, qui est significativement réduite suggère qu'HTLV-1 serait dénaturé au niveau des compartiments acides des DCs matures. Enfin, la neutralisation des compartiments acides des DCs matures qui s'accompagne de la restauration partielle de l'infection productive suggère que le virus échapperait, dans ce cas, à la dénaturation. Dans ce cas, d'ailleurs, on note une réduction de l'accumulation d'HTLV-1 dans cette population de DCs, à l'instar de ce qui se passe au niveau des IL-4 DCs : la baisse du pourcentage des DCs p19<sup>Gag+</sup> suggérerait ici que la fusion virale aurait bien eu lieu.

Ainsi, selon mon modèle, seul le pH neutre du compartiment dans lequel HTLV-1 est capturé permet d'amorcer une infection productive. De même, ce pH neutre au niveau des compartiments peut être induit au niveau des DCs matures par les agents lysosomotropes dont la chloroquine.

En conclusion, la confirmation de ce modèle nécessite des contrôles. Je pourrai, pour cela confirmer par PCR quantitative l'absence de transcription inverse de l'ARN d'HTLV-1 au niveau des DCs matures. Dans le cas contraire au modèle que je propose, si la restriction au niveau des DCs matures se situait à une étape post-rétro-transcription de l'ARN messager (mais en pré-intégration au niveau du génome de la DC mature), je serais capable de retrouver l'ADN du provirus au niveau des DCs matures sans qu'une intégration ne puisse avoir lieu.

La figure 3 illustre le mécanisme hypothétique de la corrélation inverse entre la capture virale après 3 heures de coculture virus-DCs et l'infection productive des DCs à 3 jours de coculture.



**Figure 3 :** Schéma hypothétique sur la différence de capture d'HTLV-1 entre des DCs où le compartiment CD82+ est neutre (A) et des DCs où le compartiment CD82+ est acide (B). En (A), le pH neutre des compartiments est favorable au virus qui conserve son pouvoir infectieux, qui libère son matériel génétique qui est rétro-transcrit et qui peut donner lieu à une infection productive. En (B), le pH acide des vésicules des DCs matures dénature les virions. Les virions restent dans le compartiment acide qui les concentre. C'est ce qui pourrait expliquer pourquoi le

pourcentage de DCs ayant capturés HTLV-1 semble être plus élevé dans le cas des DCs matures par rapport au cas décrit en (A). Pour simplifier le schéma, une DC est représentée par sa double membrane. Elle renferme un noyau et une vésicule CD82+.

#### 4-4-2 A quoi est due la restriction au niveau des MDDCs matures ?

Que nous soyons au niveau des IL-4 DCs ou au niveau des IL-4 DCs maturées au LPS ou au niveau des IFN- $\alpha$  DCs, les taux d'infection productive sont dans l'ensemble bas. Ils culminent à 0.57 % pour les IL-4 DCs et à 0.19 % et 0.12% pour les IL-4 DCs traités au LPS et les IFN- $\alpha$  DCs respectivement. Pour cela, nous pourrions ici supposer l'existence d'un ou de plusieurs facteur(s) de restriction antirétroviral(aux) qui limiterait/ent spécifiquement l'infection des DCs myéloïdes par HTLV-1.

SAMHD1 est l'exemple d'un facteur de restriction à de nombreux rétrovirus (virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1), le virus de la leucémie murine, le virus de l'anémie infectieuse équine) au niveau des DCs myéloïdes. SAMHD1 contient des domaines dNTPases qui limitent la synthèse de l'ADN complémentaire du virus dans ces cellules à travers la déplétion du pool de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP). SAMHD1 possède également une activité RNAase qui contribue également à la restriction (Laguette et al., 2011). Cependant, le traitement des DCs par Vpx, la protéine accessoire du VIH-2, conduit à la dégradation de SAMHD1 au niveau du protéasome. La dégradation de SAMHD1 restitue aux DCs une susceptibilité 8 fois plus importante à l'infection en comparaison avec la situation où Vpx est exprimée (Laguette et al., 2011) et (Hertoghs et al., 2015). De plus, SAMHD1 restreint l'infection à HTLV-1 dans les monocytes, *in vitro* : STING, un détecteur de l'ADN détecte ici les intermédiaires de transcription inverse dans les monocytes. Il s'en suit l'induction d'une réponse anti-virale qui se manifeste, ici par l'apoptose médiée par STING des monocytes *in vitro* (Sze et al., 2013). Au contraire, les études de Franchini montrent, qu'*in vivo*, trois sous-types de monocytes (les monocytes classiques, intermédiaires et non classiques) sont infectés par HTLV-1. De plus, ces populations de monocytes renferment des proportions significatives de cellules exprimant SAMHD1 (de Castro-Amarante et al., 2015). Néanmoins, il n'est pas connu si ces monocytes infectés, *in vivo*, par HTLV-1 sont SAMHD1 négatif ou pas. En revanche, Gramberg a montré que SAMHD1 ne peut pas restreindre l'infection par HTLV-1 dans des modèles de DCs ou de macrophages dérivées de monocytes (Gramberg et al., 2013). D'ailleurs Gramberg suggère qu'HTLV-1 ait développé un mécanisme, jusqu'à l'heure inconnu, qui le rend résistant à la restriction par SAMHD1. Ainsi, en dehors du

rôle de SAMHD1 dans la restriction, *in vitro*, de l'infection des monocytes, SAMHD1 ne peut pas expliquer pourquoi les taux d'infection par HTLV-1 sont relativement bas au niveau des population de DCs.

D'autres facteurs de restrictions à HTLV-1 sont décrits au niveau d'autres types cellulaires :

Au niveau des cellules pré-monocytaires U937, le transactivateur CIITA du complexe majeur d'histocompatibilité CMH-II est un facteur de restriction d'HTLV-1. CIITA a pour cible la protéine transactivatrice Tax dont il inhibe les fonctions. Ici, CIITA affecte l'interaction physique et fonctionnelle de Tax-1 avec les coactivateurs cellulaires dont le PCAF (pour p300/CBP-associated factor), CREB (pour cyclic AMP-responsive element binding protein) et ATF1 (pour activating transcription factor 1) qui sont tous requis pour l'activation optimale du promoteur d'HTLV-1 (Tosi et al., 2011). Cette restriction exercé par CIITA au niveau des cellules pré-monocytaires ne peut également pas expliquer la restriction dans mon modèle d'étude. En effet, au niveau des MDSCs, la restriction se situe à une étape antérieure à l'intégration provirale et ne peut donc pas impliquer des facteurs cellulaires, comme CIITA, qui interagissent avec Tax.

Actuellement, beaucoup d'attention est portée sur le rôle des microARN des cellules eucaryotes à la fois dans la restriction virale mais aussi, au contraire, au cours de la pathogenèse virale. Les microARN sont de courts ARN simples brins capables d'extinction de l'expression d'un gène. Les microRNAs agissent en facteurs de restrictions anti-viraux à travers la sous-régulation de l'expression des gènes viraux, la dégradation des ARNm ou l'inhibition de la traduction de l'ARNm. Au contraire, les microARN peuvent favoriser la réplication virale et l'infectivité virale en antagonisant, par exemple, les réponses IFN (Pfeffer et al., 2004). En plus des miRNA codés par la cellule hôte, les génomes des virus VIH-1 et l'Epstein-Barr virus (EBV) codent pour des miRNAs impliqués dans la régulation de l'expression des gènes cellulaires mais aussi dans la latence virale (Detsika et al., 2012). Les cibles du miRNA du génome d'EBV incluent ici des régulateurs de la prolifération et de l'apoptose des lymphocytes B, des cytokines, des régulateurs de la transcription (Pfeffer et al., 2004).

Dans ce contexte, Bai et Nicot ont testé le rôle de miR-28-3p dans le cadre de la restriction des lymphocytes naïfs à l'infection par HTLV-1. En effet, l'expression de miR-28-3p est 5 à 10 fois plus importante au niveau des lymphocytes naïfs qui sont résistants à l'infection par HTLV-1 en comparaison aux lymphocytes activés qui sont susceptibles à cette infection. Pour cela, les auteurs ont co-transfecté des lymphocytes T avec les clones moléculaires d'HTLV-1 en présence ou en

absence du plasmide d'expression de miR-28. Leurs résultats ont démontré ici la baisse de Gag p19 ou p24 au niveau des lymphocytes T en présence du plasmide de miR-28. Les auteurs ont enfin suggéré que miR-28-3p inhiberait la transcription inverse d'HTLV-1 en prévenant la formation du complexe de pré-intégration. En effet, les produits de la transcription inverse sont réduits lors de l'expression de miR-28-3p en comparaison aux cellules contrôles (Bai and Nicot, 2015). Dans notre contexte, miR-28-3p représenterait l'exemple d'un facteur de restriction d'HTLV-1 connu dans les lymphocytes et qu'il serait intéressant de tester au niveau des MDDCs. Les exemples précédents révèlent qu'en dehors de quelques exemples connus de facteurs de restriction de l'infection à HTLV-1 au niveau des monocytes ou des lymphocytes, rien n'est connu sur la restriction au niveau des DCs, en dehors du fait que SAMHD1 n'y est pas impliqué.

Mes résultats montrent que les IL-4 DCs, les IL-4 DCs traités à l'IFN et les IL-4 DCs traités à la flagelline constituent des sous-types de DCs permissifs à l'infection productive par HTLV-1. Au contraire, les IFN- $\alpha$  DCs, les IL-4 DCs stimulés au LPS, au PolyI:C ou au R848 restreignent l'infection par HTLV-1. Dans ce contexte, Banchereau a montré que les IL-4 DCs, les IFN- $\alpha$  DCs et chacune des populations des IL-4 DCs différemment stimulées possèdent un programme transcriptionnel bien spécifique (Banchereau et al., 2014). Les listes de gènes exprimés dans ces différentes conditions est disponible en ligne (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Il sera possible, en partant de ces données de transcriptomique, d'identifier à travers des études bioinformatiques les facteurs de restriction induits lors de la maturation des DCs. En partageant les DCs différemment stimulées en deux groupes (le groupe des DCs permissives et le groupe des DCs restrictives à l'infection par HTLV-1), une étude bioinformatique permettra d'identifier *in silico* une liste de gènes qui seraient exprimés dans les DCs matures mais qui seraient absents des DCs immatures. La vérification, *in vitro*, que l'extinction d'un gène dans les DCs matures réduit leur résistance à l'infection par HTLV-1, et qu'à l'inverse son expression dans les DCs immatures restreint leur infection permettra de confirmer qu'il s'agit bien de facteurs de restriction.

Comme les analyses bioinformatiques risquent de générer de multiples gènes hypothétiquement impliqués dans la restriction à l'infection productive, le choix des gènes à tester se fera en tenant compte, en priorité, de deux critères : en premier, il faudra que le gène code pour une protéine connue pour interagir avec des virus. Ensuite, parmi les facteurs de restriction potentiels, une attention particulière pourra être accordée aux gènes impliqués dans l'autophagie dans la mesure où le traitement des DCs mature par la choroquine parvient à restaurer, quoique incomplètement,

l'infection productive. Une attention moindre peut être accordée aux ISGs dans la mesure où mes résultats montrent que l'IFN ne restreint pas l'infection productive des IL-4 DCs.

#### 4-5 Pourquoi l'interféron restreint l'infection des lymphocytes T mais ne restreint pas l'infection des DCs par HTLV-1 ?

Nous avons mis en évidence que les DCs infectées par HTLV-1 n'expriment pas les marqueurs de maturation (résultats non montrés). En effet, les DCs Tax+ ne sur-régulent pas CD40, CD80 et CD86. De même, nous avons mesuré une production d'IFN- $\alpha$  dans les cultures de DCs infectées ce qui pourrait suggérer que l'infection des DCs par HTLV-1 interfère avec la production de l'IFN. Cependant, sachant que la quantité de DCs infectées est faible, il est possible que la technique de détection de l'IFN via les cellules reportrices HL116 soit, dans ce cas, peu sensible : les cellules reportrices HL116 ne permettent pas de détecter moins de 2.5U/ml d'IFN de type I.

Néanmoins, nous avons pu mettre en évidence que le pré-traitement des DCs par l'IFN exogène n'exerce aucun effet sur le cours de l'infection productive. Ce résultat sur le pré-traitement des DCs à l'IFN- $\alpha$  est opposé à celui obtenu, par Anne Cachat au niveau des lymphocytes T pré-traités (Cachat et al., 2013). En effet, Cachat a montré que la baisse de l'infection des lymphocytes est aussi d'autant plus importante que la concentration d'IFN- $\alpha$  utilisée en pré-traitement des lymphocytes est importante. Cachat a démontré que les effets restricteurs de l'IFN- $\alpha$  sont liés à PKR (pour protéine kinase R) et particulièrement à sa forme phosphorylée (Cachat et al., 2013).

Cependant, l'IFN peut également avoir un effet proviral à travers l'induction d'autres gènes qui faciliteraient l'infection. Par exemple, ADAR contre balance l'effet de PKR et facilite la réplication d'HTLV-1 au niveau des lymphocytes T (Cachat et al., 2014). C'est donc l'équilibre entre l'expression des ISGs avec une activité antivirale et les ISGs ayant une activité provirale qui détermine le devenir de l'infection. C'est pour cela qu'il serait intéressant d'étudier l'expression d'ADAR et de phopho-PKR au niveau des DCs stimulées à l'IFN en comparaison à leur expression au niveau des lymphocytes T dans les mêmes conditions. On pourra ainsi juger si l'induction de phopho-PKR est insuffisante au niveau des DCs en comparaison aux lymphocytes ou si, au contraire l'expression d'ADAR à la suite du pré-traitement par l'IFN est plus importante au niveau des DCs en comparaison aux lymphocytes T.

De plus, la réponse à l'IFN pourrait dépendre du type cellulaire et de la nature des chimiokines produites (Hilkens et al., 2003). En effet, Hilkens a montré que la chimiokine IP-10 (pour

interferon gamma-induced protein 10) et l'iNOS (pour inductible nitric oxide synthase) sont induits dans les DCs par les IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\alpha$ 21 et IFN- $\alpha$ 1. Au contraire, l'induction de l'IP-10 et de l'iNOS est marginale au niveau des lymphocytes T, dans les mêmes conditions. Au contraire des deux cas précédents, l'IL-12R $\beta$ 2 est un exemple de gène sur-régulé dans les lymphocytes T mais pas dans les DCs à la suite d'une stimulation IFN (Hilkens et al., 2003). Ces exemples illustrent que l'induction des gènes par l'IFN est tissu-spécifique. Ainsi, une même stimulation par l'IFN peut induire une expression différente de gènes au niveau des DCs ou des lymphocytes T. Cette différence au niveau des programmes transcriptionnels entre les DCs et les lymphocytes T après leur induction par l'IFN pourrait donc expliquer la susceptibilité ou la résistance à l'infection par HTLV-1.

Enfin, ces constatations nous emmènent à nous demander comment peut se répercuter à un niveau clinique cette différence de sensibilité entre DCs et lymphocytes à l'IFN $\alpha$ 2. La réponse à cette question est d'autant plus importante que l'IFN $\alpha$ 2 est utilisé en combinaison avec l'AZT dans le traitement des patients ATL (Hermine et al., 1995). Bien que non utilisée au Japon, la combinaison IFN $\alpha$ 2 et AZT semble donner les meilleurs résultats pour traiter les patients atteints des formes indolentes et chroniques d'ATL (Nasr et al., 2017). Cependant, Hermine a, montré que la combinaison AZT/IFN ne constitue pas une thérapie radicale en raison du taux de rechute élevé (Hermine et al., 2002). Ainsi, on peut se demander si les DCs infectées ne seraient pas responsables de ces rechutes en raison de leur résistance à l'action anti-virale de l'IFN. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait suivre, au cours d'une étude clinique, l'évolution de la charge virale des lymphocytes et des DCs sur un nombre significatif de patients traités par la combinaison IFN/AZT. Dans le cas où la charge virale au niveau des DCs se maintient le long du traitement, les DCs infectées pourront être incriminés dans les rechutes. Ce qui justifierait ici le recours au suivi de cas cliniques est que la susceptibilité des cellules à la réponse à l'IFN *in vivo* n'est pas transposable à la susceptibilité des cellules *in vitro*. D'ailleurs, dans une expérience réalisée par Bazarbachi, la combinaison AZT/IFN- $\alpha$  n'a aucun effet, *ex vivo*, sur des cellules leucémiques recueillies auprès d'une patiente leucémique. Néanmoins, la combinaison AZT/IFN- $\alpha$  chez cette patiente a donné une rémission au bout de 8 mois de traitement (Bazarbachi et al., 2000).

### Conclusion :

Malgré les limites de mon étude qui sont inhérentes à toute étude *in vitro*, mes résultats éclairent sur la complexité des interactions entre les sous-types de MDDCs et HTLV-1. Mes résultats montrent qu'*in vitro* seules les IL-4 DCs sont susceptibles à l'infection productive et peuvent transmettre HTLV-1 aux lymphocytes T au contraire des DCs matures. Enfin, si la comparaison entre VIH-1 et HTLV-1 montre que les DCs conservent la même susceptibilité aux deux rétrovirus, il n'en est pas de même pour la capacité des sous-types de DCs à transmettre VIH-1 et HTLV-1. En effet, contrairement à VIH-1, HTLV-1 ne peut être transmis aux lymphocytes T que via des DCs immatures. Ainsi, en dépit de toutes les stratégies qu'HTLV-1 a développées pour contourner les fonctions des DCs et assurer sa persistance, l'incapacité des DCs matures à s'infecter productivement et à transmettre HTLV-1 aux lymphocytes T bénéficierait dans ce cas à l'individu infecté chez qui la transmission d'HTLV-1 se trouve donc limitée.



## 5 Bibliographie

- Adolph, M.B., Webb, J., and Chelico, L. (2013). Retroviral restriction factor APOBEC3G delays the initiation of DNA synthesis by HIV-1 reverse transcriptase. *PLoS One* 8, e64196.
- Ahn, J.S., and Agrawal, B. (2005). IL-4 is more effective than IL-13 for in vitro differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells. *Int. Immunol.* 17, 1337–1346.
- Alais, S., Mahieux, R., and Dutartre, H. (2015). Viral Source-Independent High Susceptibility of Dendritic Cells to Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection Compared to That of T Lymphocytes. *J. Virol.* 89, 10580–10590.
- Albert, M.L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, 86–89.
- Alefantis, T., Mostoller, K., Jain, P., Harhaj, E., Grant, C., and Wigdahl, B. (2005). Secretion of the human T cell leukemia virus type I transactivator protein tax. *J. Biol. Chem.* 280, 17353–17362.
- Alvarez, C., Gotuzzo, E., Vandamme, A.-M., and Verdonck, K. (2016). Family Aggregation of Human T-Lymphotropic Virus 1-Associated Diseases: A Systematic Review. *Front. Microbiol.* 7, 1674.
- Alvarez, C.P., Lasala, F., Carrillo, J., Muñiz, O., Corbí, A.L., and Delgado, R. (2002). C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J. Virol.* 76, 6841–6844.
- Analo, H.I., Akanmu, A.S., Akinsete, I., Njoku, O.S., and Okany, C.C. (1998). Seroprevalence study of HTLV-1 and HIV infection in blood donors and patients with lymphoid malignancies in Lagos, Nigeria. *Cent. Afr. J. Med.* 44, 130–134.
- Arikawa, K., Takuwa, N., Yamaguchi, H., Sugimoto, N., Kitayama, J., Nagawa, H., Takehara, K., and Takuwa, Y. (2003). Ligand-dependent inhibition of B16 melanoma cell migration and invasion via endogenous S1P2 G protein-coupled receptor. Requirement of inhibition of cellular RAC activity. *J. Biol. Chem.* 278, 32841–32851.
- Arnold, J., Zimmerman, B., Li, M., Lairmore, M.D., and Green, P.L. (2008). Human T-cell leukemia virus type-1 antisense-encoded gene, Hbz, promotes T-lymphocyte proliferation. *Blood* 112, 3788–3797.
- Arredondo, M., de Bethencourt, F., Treviño, A., Collado, A., Torres, P., Barbolla, L., Soriano, V., and de Mendoza, C. (2012). Short communication: RNASEL alleles and susceptibility to infection by human retroviruses and hepatitis viruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 28, 1259–1261.
- Ashenberg, O., Padmakumar, J., Doud, M.B., and Bloom, J.D. (2017). Deep mutational scanning identifies sites in influenza nucleoprotein that affect viral inhibition by MxA. *PLoS Pathog.* 13, e1006288.
- Aspenström, P., Lindberg, U., and Hall, A. (1996). Two GTPases, Cdc42 and Rac, bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr. Biol.* 6, 70–75.

- Bachem, A., Güttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H.W., et al. (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* *207*, 1273–1281.
- Bai, X.T., and Nicot, C. (2012). Overview on HTLV-1 p12, p8, p30, p13: accomplices in persistent infection and viral pathogenesis. *Front. Microbiol.* *3*, 400.
- Bai, X.T., and Nicot, C. (2015). Mir-28-3p Is a Cellular Restriction Factor That Inhibits Human T Cell Leukemia Virus, Type 1 (htlv-1) Replication and Virus Infection. *J. Biol. Chem.* *290*, 5381–5390.
- Bain, C., Fatmi, A., Zoulim, F., Zarski, J.P., Trépo, C., and Inchauspé, G. (2001). Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* *120*, 512–524.
- Bam, R.A., Hansen, D., Irrinki, A., Mulato, A., Jones, G.S., Hesselgesser, J., Frey, C.R., Cihlar, T., and Yant, S.R. (2017). TLR7 Agonist GS-9620 Is a Potent Inhibitor of Acute HIV-1 Infection in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* *61*.
- Banchereau, R., Baldwin, N., Cepika, A.-M., Athale, S., Xue, Y., Yu, C.I., Metang, P., Cheruku, A., Berthier, I., Gayet, I., et al. (2014). Transcriptional specialization of human dendritic cell subsets in response to microbial vaccines. *Nat. Commun.* *5*, 5283.
- Barton, G.M., and Kagan, J.C. (2009). A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 535–542.
- Basbous, J., Arpin, C., Gaudray, G., Piechaczyk, M., Devaux, C., and Mesnard, J.-M. (2003). The HBZ factor of human T-cell leukemia virus type I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and modulates their transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* *278*, 43620–43627.
- Basu, A., Komazin-Meredith, G., McCarthy, C., Antanasijevic, A., Cardinale, S.C., Mishra, R.K., Barnard, D.L., Caffrey, M., Rong, L., and Bowlin, T.L. (2017). Molecular Mechanism Underlying the Action of Influenza A Virus Fusion Inhibitor MBX2546. *ACS Infect. Dis.*
- Bauer, D., and Tampé, R. (2002). Herpes viral proteins blocking the transporter associated with antigen processing TAP—from genes to function and structure. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *269*, 87–99.
- Baydoun, H.H., Pancewicz, J., and Nicot, C. (2011). Human T-lymphotropic type 1 virus p30 inhibits homologous recombination and favors unfaithful DNA repair. *Blood* *117*, 5897–5906.
- Bazarbachi, A., Nasr, R., El-Sabban, M.E., Mahé, A., Mahieux, R., Gessain, A., Darwiche, N., Dbaibo, G., Kersual, J., Zermati, Y., et al. (2000). Evidence against a direct cytotoxic effect of alpha interferon and zidovudine in HTLV-I associated adult T cell leukemia/lymphoma. *Leukemia* *14*, 716–721.
- Bego, M.G., Mercier, J., and Cohen, E.A. (2012). Virus-activated interferon regulatory factor 7 upregulates expression of the interferon-regulated BST2 gene independently of interferon signaling. *J. Virol.* *86*, 3513–3527.
- Belardelli, F. (1995). Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* *103*, 161–179.

- Bellon, M., Baydoun, H.H., Yao, Y., and Nicot, C. (2010). HTLV-I Tax-dependent and -independent events associated with immortalization of human primary T lymphocytes. *Blood* *115*, 2441–2448.
- Benvenuti, F., Hugues, S., Walmsley, M., Ruf, S., Fetler, L., Popoff, M., Tybulewicz, V.L.J., and Amigorena, S. (2004). Requirement of Rac1 and Rac2 expression by mature dendritic cells for T cell priming. *Science* *305*, 1150–1153.
- Biddison, W.E., Kubota, R., Kawanishi, T., Taub, D.D., Cruikshank, W.W., Center, D.M., Connor, E.W., Utz, U., and Jacobson, S. (1997). Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I)-specific CD8<sup>+</sup> CTL clones from patients with HTLV-I-associated neurologic disease secrete proinflammatory cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinase. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *159*, 2018–2025.
- Bigley, V., McGovern, N., Milne, P., Dickinson, R., Pagan, S., Cookson, S., Haniffa, M., and Collin, M. (2015). Langerin-expressing dendritic cells in human tissues are related to CD1c<sup>+</sup> dendritic cells and distinct from Langerhans cells and CD141<sup>high</sup> XCR1<sup>+</sup> dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* *97*, 627–634.
- Bittencourt, A.L., Barbosa, H.S., Vieira, M.D.G., and Farré, L. (2009). Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) presenting in the skin: clinical, histological and immunohistochemical features of 52 cases. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* *48*, 598–604.
- Blanchet, F.P., Moris, A., Nikolic, D.S., Lehmann, M., Cardinaud, S., Stalder, R., Garcia, E., Dinkins, C., Leuba, F., Wu, L., et al. (2010). Human immunodeficiency virus-1 inhibition of immunoamphisomes in dendritic cells impairs early innate and adaptive immune responses. *Immunity* *32*, 654–669.
- Boasso, A., Vaccari, M., Hryniewicz, A., Fuchs, D., Nacsá, J., Cecchinato, V., Andersson, J., Franchini, G., Shearer, G.M., and Chougnat, C. (2007). Regulatory T-cell markers, indoleamine 2,3-dioxygenase, and virus levels in spleen and gut during progressive simian immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* *81*, 11593–11603.
- Brown, K.N., Wijewardana, V., Liu, X., and Barratt-Boyes, S.M. (2009). Rapid influx and death of plasmacytoid dendritic cells in lymph nodes mediate depletion in acute simian immunodeficiency virus infection. *PLoS Pathog.* *5*, e1000413.
- Burgdorf, S., Kautz, A., Böhnert, V., Knolle, P.A., and Kurts, C. (2007). Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* *316*, 612–616.
- Burns, S., Thrasher, A.J., Blundell, M.P., Machesky, L., and Jones, G.E. (2001). Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood* *98*, 1142–1149.
- Cachat, A., Villaudy, J., Rigal, D., Gazzolo, L., and Duc Dodon, M. (2012). [Mice are not Men and yet... how humanized mice inform us about human infectious diseases]. *Med. Sci. MS* *28*, 63–68.
- Cachat, A., Chevalier, S.A., Alais, S., Ko, N.L., Ratner, L., Journo, C., Dutartre, H., and Mahieux, R. (2013). Alpha interferon restricts human T-lymphotropic virus type 1 and 2 de novo infection through PKR activation. *J. Virol.* *87*, 13386–13396.
- Cachat, A., Alais, S., Chevalier, S.A., Journo, C., Fusil, F., Dutartre, H., Boniface, A., Ko, N.L., Gessain, A., Cosset, F.-L., et al. (2014). ADAR1 enhances HTLV-1 and HTLV-2 replication through inhibition of PKR activity. *Retrovirology* *11*, 93.

Canque, B., Bakri, Y., Camus, S., Yagello, M., Benjouad, A., and Gluckman, J.C. (1999). The susceptibility to X4 and R5 human immunodeficiency virus-1 strains of dendritic cells derived in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells is primarily determined by their maturation stage. *Blood* 93, 3866–3875.

Cardinaud, S., Urrutia, A., Rouers, A., Coulon, P.-G., Keruevan, J., Richetta, C., Bet, A., Maze, E.A., Larsen, M., Iglesias, M.-C., et al. (2017). Triggering of TLR-3, -4, NOD2 and DC-SIGN reduces viral replication and increases T-cell activation capacity of HIV-infected human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.*

Carneiro-Proietti, A.B.F., Sabino, E.C., Leão, S., Salles, N.A., Loureiro, P., Sarr, M., Wright, D., Busch, M., Proietti, F.A., Murphy, E.L., et al. (2012). Human T-lymphotropic virus type 1 and type 2 seroprevalence, incidence, and residual transfusion risk among blood donors in Brazil during 2007-2009. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 28, 1265–1272.

Carneiro-Proietti, A.B.F., Amaranto-Damasio, M.S., Leal-Horiguchi, C.F., Bastos, R.H.C., Seabra-Freitas, G., Borowiak, D.R., Ribeiro, M.A., Proietti, F.A., Ferreira, A.S.D., and Martins, M.L. (2014). Mother-to-Child Transmission of Human T-Cell Lymphotropic Viruses-1/2: What We Know, and What Are the Gaps in Understanding and Preventing This Route of Infection. *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.* 3 *Suppl* 1, S24-29.

de Castro-Amarante, M.F., Pise-Masison, C.A., McKinnon, K., Washington Parks, R., Galli, V., Omsland, M., Andresen, V., Massoud, R., Brunetto, G., Caruso, B., et al. (2015). Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Infection of the Three Monocyte Subsets Contributes to Viral Burden in Humans. *J. Virol.* 90, 2195–2207.

Ceccaldi, P.-E., Delebecque, F., Prevost, M.-C., Moris, A., Abastado, J.-P., Gessain, A., Schwartz, O., and Ozden, S. (2006). DC-SIGN facilitates fusion of dendritic cells with human T-cell leukemia virus type 1-infected cells. *J. Virol.* 80, 4771–4780.

Chen, R., Zhao, X., Wang, Y., Xie, Y., and Liu, J. (2017a). Hepatitis B virus X protein is capable of down-regulating protein level of host antiviral protein APOBEC3G. *Sci. Rep.* 7, 40783.

Chen, Y.-B., Li, S.-D., He, Y.-P., Shi, X.-J., Chen, Y., and Gong, J.-P. (2009). Immunosuppressive effect of IDO on T cells in patients with chronic hepatitis B\*. *Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.* 39, 463–468.

Chen, Y.-C., Backus, K.M., Merkulova, M., Yang, C., Brown, D., Cravatt, B.F., and Zhang, C. (2017b). Covalent Modulators of the Vacuolar ATPase. *J. Am. Chem. Soc.* 139, 639–642.

Chevalier, S.A., Turpin, J., Cachat, A., Afonso, P.V., Gessain, A., Brady, J.N., Pise-Masison, C.A., and Mahieux, R. (2014). Gem-Induced Cytoskeleton Remodeling Increases Cellular Migration of HTLV-1-Infected Cells, Formation of Infected-to-Target T-Cell Conjugates and Viral Transmission. *PLoS Pathog.* 10, e1003917.

Chu, C.-C., Ali, N., Karagiannis, P., Di Meglio, P., Skowera, A., Napolitano, L., Barinaga, G., Gryns, K., Sharif-Paghaleh, E., Karagiannis, S.N., et al. (2012). Resident CD141 (BDCA3)+ dendritic cells in human skin produce IL-10 and induce regulatory T cells that suppress skin inflammation. *J. Exp. Med.* 209, 935–945.

Cohn, L., Chatterjee, B., Esselborn, F., Smed-Sørensen, A., Nakamura, N., Chalouni, C., Lee, B.-C., Vandlen, R., Keler, T., Lauer, P., et al. (2013). Antigen delivery to early endosomes eliminates the superiority of human blood BDCA3+ dendritic cells at cross presentation. *J. Exp. Med.* 210, 1049–1063.

Coleman, C.M., Spearman, P., and Wu, L. (2011). Tetherin does not significantly restrict dendritic cell-mediated HIV-1 transmission and its expression is upregulated by newly synthesized HIV-1 Nef. *Retrovirology* 8, 26.

Conry, S.J., Milkovich, K.A., Yonkers, N.L., Rodriguez, B., Bernstein, H.B., Asaad, R., Heinzl, F.P., Tary-Lehmann, M., Lederman, M.M., and Anthony, D.D. (2009). Impaired plasmacytoid dendritic cell (PDC)-NK cell activity in viremic human immunodeficiency virus infection attributable to impairments in both PDC and NK cell function. *J. Virol.* 83, 11175–11187.

Cook, L.B.M., Melamed, A., Demontis, M.A., Laydon, D.J., Fox, J.M., Tosswill, J.H.C., de Freitas, D., Price, A.D., Medcalf, J.F., Martin, F., et al. (2016). Rapid dissemination of human T-lymphotropic virus type 1 during primary infection in transplant recipients. *Retrovirology* 13, 3.

Currer, R., Van Duyne, R., Jaworski, E., Guendel, I., Sampey, G., Das, R., Narayanan, A., and Kashanchi, F. (2012). HTLV tax: a fascinating multifunctional co-regulator of viral and cellular pathways. *Front. Microbiol.* 3, 406.

Czeloth, N., Bernhardt, G., Hofmann, F., Genth, H., and Förster, R. (2005). Sphingosine-1-phosphate mediates migration of mature dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 175, 2960–2967.

Czubala, M.A., Finsterbusch, K., Ivory, M.O., Mitchell, J.P., Ahmed, Z., Shimauchi, T., Karoo, R.O.S., Coulman, S.A., Gateley, C., Birchall, J.C., et al. (2016). TGF $\beta$  Induces a SAMHD1-Independent Post-Entry Restriction to HIV-1 Infection of Human Epithelial Langerhans Cells. *J. Invest. Dermatol.* 136, 1981–1989.

Datta, A., Sinha-Datta, U., Dhillon, N.K., Buch, S., and Nicot, C. (2006). The HTLV-I p30 interferes with TLR4 signaling and modulates the release of pro- and anti-inflammatory cytokines from human macrophages. *J. Biol. Chem.* 281, 23414–23424.

Delaguillaumie, A., Harriague, J., Kohanna, S., Bismuth, G., Rubinstein, E., Seigneuret, M., and Conjeaud, H. (2004). Tetraspanin CD82 controls the association of cholesterol-dependent microdomains with the actin cytoskeleton in T lymphocytes: relevance to co-stimulation. *J. Cell Sci.* 117, 5269–5282.

Desai, T.M., Marin, M., Mason, C., and Melikyan, G.B. (2017). pH regulation in early endosomes and interferon-inducible transmembrane proteins control avian retrovirus fusion. *J. Biol. Chem.*

Detsika, M.G., Psarris, A., and Paraskevis, D. (2012). MicroRNAs and HIV latency: a complex and promising relationship. *AIDS Rev.* 14, 188–194.

Dolganiuc, A., Kodys, K., Kopasz, A., Marshall, C., Do, T., Romics, L., Mandrekar, P., Zapp, M., and Szabo, G. (2003). Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 170, 5615–5624.

Dolganiuc, A., Paek, E., Kodys, K., Thomas, J., and Szabo, G. (2008). Myeloid dendritic cells of patients with chronic HCV infection induce proliferation of regulatory T lymphocytes. *Gastroenterology* 135, 2119–2127.

Donaghy, H., Pozniak, A., Gazzard, B., Qazi, N., Gilmour, J., Gotch, F., and Patterson, S. (2001). Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* 98, 2574–2576.

- Donaghy, H., Gazzard, B., Gotch, F., and Patterson, S. (2003). Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood* *101*, 4505–4511.
- Donegan, E., Lee, H., Operskalski, E.A., Shaw, G.M., Kleinman, S.H., Busch, M.P., Stevens, C.E., Schiff, E.R., Nowicki, M.J., and Hollingsworth, C.G. (1994). Transfusion transmission of retroviruses: human T-lymphotropic virus types I and II compared with human immunodeficiency virus type 1. *Transfusion (Paris)* *34*, 478–483.
- Dong, C., Janas, A.M., Wang, J.-H., Olson, W.J., and Wu, L. (2007). Characterization of human immunodeficiency virus type 1 replication in immature and mature dendritic cells reveals dissociable cis- and trans-infection. *J. Virol.* *81*, 11352–11362.
- Dong, C.K., Patel, V., Yang, J.C., Dvorin, J.D., Duraisingh, M.T., Clardy, J., and Wirth, D.F. (2009). Type II NADH dehydrogenase of the respiratory chain of *Plasmodium falciparum* and its inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *19*, 972–975.
- Dorner, B.G., Dorner, M.B., Zhou, X., Opitz, C., Mora, A., Güttler, S., Hutloff, A., Mages, H.W., Ranke, K., Schaefer, M., et al. (2009). Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells. *Immunity* *31*, 823–833.
- Duluc, D., Banchereau, R., Gannevat, J., Thompson-Snipes, L., Blanck, J.-P., Zurawski, S., Zurawski, G., Hong, S., Rossello-Urgell, J., Pascual, V., et al. (2014). Transcriptional fingerprints of antigen-presenting cell subsets in the human vaginal mucosa and skin reflect tissue-specific immune microenvironments. *Genome Med.* *6*, 98.
- Egli, A., Santer, D.M., O’Shea, D., Tyrrell, D.L., and Houghton, M. (2014). The impact of the interferon-lambda family on the innate and adaptive immune response to viral infections. *Emerg. Microbes Infect.* *3*, e51.
- El-Awady, A.R., Miles, B., Scisci, E., Kurago, Z.B., Palani, C.D., Arce, R.M., Waller, J.L., Genco, C.A., Slocum, C., Manning, M., et al. (2015). *Porphyromonas gingivalis* evasion of autophagy and intracellular killing by human myeloid dendritic cells involves DC-SIGN-TLR2 crosstalk. *PLoS Pathog.* *10*, e1004647.
- Elsen, S., Doussière, J., Villiers, C.L., Faure, M., Berthier, R., Papaioannou, A., Grandvaux, N., Marche, P.N., and Vignais, P.V. (2004). Cryptic O<sub>2</sub>-generating NADPH oxidase in dendritic cells. *J. Cell Sci.* *117*, 2215–2226.
- Farkas, A., and Kemény, L. (2011). Interferon- $\alpha$  in the generation of monocyte-derived dendritic cells: recent advances and implications for dermatology. *Br. J. Dermatol.* *165*, 247–254.
- Farkas, A., Tonel, G., and Nestle, F.O. (2008). Interferon-alpha and viral triggers promote functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Br. J. Dermatol.* *158*, 921–929.
- Faure, F., Mantegazza, A., Sadaka, C., Sedlik, C., Jotereau, F., and Amigorena, S. (2009). Long-lasting cross-presentation of tumor antigen in human DC. *Eur. J. Immunol.* *39*, 380–390.
- Fenzia, C., Fiocchi, M., Jones, K., Parks, R.W., Ceribelli, M., Chevalier, S.A., Edwards, D., Ruscetti, F., Pise-Masison, C.A., and Franchini, G. (2014). Human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 p30, but not

p12/p8, counteracts toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 signaling in human monocytes and dendritic cells. *J. Virol.* *88*, 393–402.

Ferguson, S.M., and De Camilli, P. (2012). Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 75–88.

Feuer, G., and Green, P.L. (2005). Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *Oncogene* *24*, 5996–6004.

Filippone, C., Bassot, S., Betsem, E., Tortevoeye, P., Guillotte, M., Mercereau-Puijalon, O., Plancoulaine, S., Calattini, S., and Gessain, A. (2012). A new and frequent human T-cell leukemia virus indeterminate Western blot pattern: epidemiological determinants and PCR results in central African inhabitants. *J. Clin. Microbiol.* *50*, 1663–1672.

Franklin, A.A., Kubik, M.F., Uittenbogaard, M.N., Brauweiler, A., Utaisincharoen, P., Matthews, M.A., Dynan, W.S., Hoeffler, J.P., and Nyborg, J.K. (1993). Transactivation by the human T-cell leukemia virus Tax protein is mediated through enhanced binding of activating transcription factor-2 (ATF-2) ATF-2 response and cAMP element-binding protein (CREB). *J. Biol. Chem.* *268*, 21225–21231.

Fredericksen, B.L., Wei, B.L., Yao, J., Luo, T., and Garcia, J.V. (2002). Inhibition of endosomal/lysosomal degradation increases the infectivity of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* *76*, 11440–11446.

Freeman, R.C., Rodriguez, G.M., and French, J.F. (1995). Seroprevalence and risk factors associated with HTLV-I/II infection in injection drug users in northern New Jersey. *J. Addict. Dis.* *14*, 51–66.

Frutos, M.C., Gastaldello, R., Balangero, M., Remondegui, C., Blanco, S., Otsuki, K., Paulo Vicente, A.C., Elías, D., Mangeaud, A., Nates, S., et al. (2017). Silent dissemination of HTLV-1 in an endemic area of Argentina. Epidemiological and molecular evidence of intrafamilial transmission. *PLoS One* *12*, e0174920.

Fugier-Vivier, I., Servet-Delprat, C., Rivaller, P., Rissoan, M.C., Liu, Y.J., and Roubourdin-Combe, C. (1997). Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J. Exp. Med.* *186*, 813–823.

Fujikado, N., Saijo, S., Yonezawa, T., Shimamori, K., Ishii, A., Sugai, S., Kotaki, H., Sudo, K., Nose, M., and Iwakura, Y. (2008). DcIR deficiency causes development of autoimmune diseases in mice due to excess expansion of dendritic cells. *Nat. Med.* *14*, 176–180.

Fukudome, K., Furuse, M., Fukuhara, N., Orita, S., Imai, T., Takagi, S., Nagira, M., Hinuma, Y., and Yoshie, O. (1992). Strong induction of ICAM-1 in human T cells transformed by human T-cell-leukemia virus type 1 and depression of ICAM-1 or LFA-1 in adult T-cell-leukemia-derived cell lines. *Int. J. Cancer* *52*, 418–427.

Fukumoto, R., Dunder, M., Nicot, C., Adams, A., Valeri, V.W., Samelson, L.E., and Franchini, G. (2007). Inhibition of T-cell receptor signal transduction and viral expression by the linker for activation of T cells-interacting p12(l) protein of human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1. *J. Virol.* *81*, 9088–9099.

Gabarre, J., Gessain, A., Raphael, M., Merle-Béral, H., Dubourg, O., Fourcade, C., Gandjbakhch, I., Jault, F., Delcourt, A., and Binet, J.L. (1993). Adult T-cell leukemia/lymphoma revealed by a surgically cured

cardiac valve lymphomatous involvement in an Iranian woman: clinical, immunopathological and viromolecular studies. *Leukemia* 7, 1904–1909.

Gachon, F., Peleraux, A., Thebault, S., Dick, J., Lemasson, I., Devaux, C., and Mesnard, J.M. (1998). CREB-2, a cellular CRE-dependent transcription repressor, functions in association with Tax as an activator of the human T-cell leukemia virus type 1 promoter. *J. Virol.* 72, 8332–8337.

Gandhi, R.T., and Walker, B.D. (2002). Immunologic control of HIV-1. *Annu. Rev. Med.* 53, 149–172.

Garcia, E., Pion, M., Pelchen-Matthews, A., Collinson, L., Arrighi, J.-F., Blot, G., Leuba, F., Escola, J.-M., Demaurex, N., Marsh, M., et al. (2005). HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. *Traffic Cph. Den.* 6, 488–501.

Gardner, J.P., Durso, R.J., Arrigale, R.R., Donovan, G.P., Maddon, P.J., Dragic, T., and Olson, W.C. (2003). L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4498–4503.

Garrett, W.S., Chen, L.M., Kroschewski, R., Ebersold, M., Turley, S., Trombetta, S., Galán, J.E., and Mellman, I. (2000). Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell* 102, 325–334.

Gaudray, G., Gachon, F., Basbous, J., Biard-Piechaczyk, M., Devaux, C., and Mesnard, J.-M. (2002). The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. *J. Virol.* 76, 12813–12822.

Geijtenbeek, T.B.H., and van Kooyk, Y. (2003). Pathogens target DC-SIGN to influence their fate DC-SIGN functions as a pathogen receptor with broad specificity. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 111, 698–714.

Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., et al. (2000a). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587–597.

Geijtenbeek, T.B., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Adema, G.J., van Kooyk, Y., and Figdor, C.G. (2000b). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100, 575–585.

Geijtenbeek, T.B.H., den Dunnen, J., and Gringhuis, S.I. (2009). Pathogen recognition by DC-SIGN shapes adaptive immunity. *Future Microbiol.* 4, 879–890.

Gessain, A., and Cassar, O. (2012). Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front. Microbiol.* 3, 388.

Gessain, A., and Mahieux, R. (2012). Tropical spastic paraparesis and HTLV-1 associated myelopathy: clinical, epidemiological, virological and therapeutic aspects. *Rev. Neurol. (Paris)* 168, 257–269.

Gessain, A., Barin, F., Vernant, J.C., Gout, O., Maurs, L., Calender, A., and de Thé, G. (1985). Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet Lond. Engl.* 2, 407–410.



- Ghorbel, S., Sinha-Datta, U., Dunder, M., Brown, M., Franchini, G., and Nicot, C. (2006). Human T-cell leukemia virus type I p30 nuclear/nucleolar retention is mediated through interactions with RNA and a constituent of the 60 S ribosomal subunit. *J. Biol. Chem.* *281*, 37150–37158.
- Gobeil, L.-A., Lodge, R., and Tremblay, M.J. (2013). Macropinocytosis-like HIV-1 internalization in macrophages is CCR5 dependent and leads to efficient but delayed degradation in endosomal compartments. *J. Virol.* *87*, 735–745.
- Gomez de Agüero, M., Vocanson, M., Hacini-Rachinel, F., Taillardet, M., Sparwasser, T., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Kaiserlian, D., and Dubois, B. (2012). Langerhans cells protect from allergic contact dermatitis in mice by tolerizing CD8(+) T cells and activating Foxp3(+) regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* *122*, 1700–1711.
- Goncalves, A.-R., Moraz, M.-L., Pasquato, A., Helenius, A., Lozach, P.-Y., and Kunz, S. (2013). Role of DC-SIGN in Lassa virus entry into human dendritic cells. *J. Virol.* *87*, 11504–11515.
- Good, L., Maggirwar, S.B., and Sun, S.C. (1996). Activation of the IL-2 gene promoter by HTLV-I tax involves induction of NF-AT complexes bound to the CD28-responsive element. *EMBO J.* *15*, 3744–3750.
- Goutagny, N., Fatmi, A., De Ledinghen, V., Penin, F., Couzigou, P., Inchauspé, G., and Bain, C. (2003). Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J. Infect. Dis.* *187*, 1951–1958.
- Gramberg, T., Kahle, T., Bloch, N., Wittmann, S., Müllers, E., Daddacha, W., Hofmann, H., Kim, B., Lindemann, D., and Landau, N.R. (2013). Restriction of diverse retroviruses by SAMHD1. *Retrovirology* *10*, 26.
- Granelli-Piperno, A., Golebiowska, A., Trumfpheller, C., Siegal, F.P., and Steinman, R.M. (2004). HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 7669–7674.
- Granelli-Piperno, A., Pritsker, A., Pack, M., Shimeliovich, I., Arrighi, J.-F., Park, C.G., Trumfpheller, C., Pigué, V., Moran, T.M., and Steinman, R.M. (2005). Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 4265–4273.
- Grassmann, R., Aboud, M., and Jeang, K.-T. (2005). Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene* *24*, 5976–5985.
- Grohmann, U., Fallarino, F., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Vacca, C., Orabona, C., Uyttenhove, C., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. (2001). IL-6 inhibits the tolerogenic function of CD8 alpha+ dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *167*, 708–714.
- Groot, F., van Capel, T.M.M., Kapsenberg, M.L., Berkhout, B., and de Jong, E.C. (2006). Opposing roles of blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in HIV-1 infection of T cells: transmission facilitation versus replication inhibition. *Blood* *108*, 1957–1964.

Gross, C., Wiesmann, V., Millen, S., Kalmer, M., Wittenberg, T., Gettemans, J., and Thoma-Kress, A.K. (2016). The Tax-Inducible Actin-Bundling Protein Fascin Is Crucial for Release and Cell-to-Cell Transmission of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1). *PLOS Pathog.* *12*, e1005916.

Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. (2006). Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu. Rev. Pathol.* *1*, 23–61.

Gunawan, M., Jardine, L., and Haniffa, M. (2016). Isolation of Human Skin Dendritic Cell Subsets. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1423*, 119–128.

Guzman, E., Cubillos-Zapata, C., Cottingham, M.G., Gilbert, S.C., Prentice, H., Charleston, B., and Hope, J.C. (2012). Modified vaccinia virus Ankara-based vaccine vectors induce apoptosis in dendritic cells draining from the skin via both the extrinsic and intrinsic caspase pathways, preventing efficient antigen presentation. *J. Virol.* *86*, 5452–5466.

Hadeiba, H., Sato, T., Habtezion, A., Oderup, C., Pan, J., and Butcher, E.C. (2008). CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat. Immunol.* *9*, 1253–1260.

Halary, F., Amara, A., Lortat-Jacob, H., Messerle, M., Delaunay, T., Houlès, C., Fieschi, F., Arenzana-Seisdedos, F., Moreau, J.F., and Déchanet-Merville, J. (2002a). Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* *17*, 653–664.

Halary, F., Amara, A., Lortat-Jacob, H., Messerle, M., Delaunay, T., Houlès, C., Fieschi, F., Arenzana-Seisdedos, F., Moreau, J.F., and Déchanet-Merville, J. (2002b). Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* *17*, 653–664.

Hanon, E., Stinchcombe, J.C., Saito, M., Asquith, B.E., Taylor, G.P., Tanaka, Y., Weber, J.N., Griffiths, G.M., and Bangham, C.R. (2000). Fratricide among CD8(+) T lymphocytes naturally infected with human T cell lymphotropic virus type I. *Immunity* *13*, 657–664.

Harper, M.S., Guo, K., Gibbert, K., Lee, E.J., Dillon, S.M., Barrett, B.S., McCarter, M.D., Hasenkrug, K.J., Dittmer, U., Wilson, C.C., et al. (2015). Interferon- $\alpha$  Subtypes in an Ex Vivo Model of Acute HIV-1 Infection: Expression, Potency and Effector Mechanisms. *PLoS Pathog.* *11*, e1005254.

Haspot, F., Lavault, A., Sinzger, C., Laib Sampaio, K., Stierhof, Y.-D., Pilet, P., Bressolette-Bodin, C., and Halary, F. (2012). Human cytomegalovirus entry into dendritic cells occurs via a macropinocytosis-like pathway in a pH-independent and cholesterol-dependent manner. *PLoS One* *7*, e34795.

Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2001). Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* *1*, 126–134.

Hémont, C., Neel, A., Heslan, M., Braudeau, C., and Josien, R. (2013a). Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness. *J. Leukoc. Biol.* *93*, 599–609.

Hémont, C., Neel, A., Heslan, M., Braudeau, C., and Josien, R. (2013b). Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness. *J. Leukoc. Biol.* *93*, 599–609.

- Hermine, O., Bouscary, D., Gessain, A., Turlure, P., Leblond, V., Franck, N., Buzyn-Veil, A., Rio, B., Macintyre, E., and Dreyfus, F. (1995). Brief report: treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma with zidovudine and interferon alfa. *N. Engl. J. Med.* *332*, 1749–1751.
- Hermine, O., Allard, I., Lévy, V., Arnulf, B., Gessain, A., Bazarbachi, A., and French ATL therapy group (2002). A prospective phase II clinical trial with the use of zidovudine and interferon-alpha in the acute and lymphoma forms of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Hematol. J. Off. J. Eur. Haematol. Assoc.* *3*, 276–282.
- Hertoghs, N., van der Aar, A.M.G., Setiawan, L.C., Kootstra, N.A., Gringhuis, S.I., and Geijtenbeek, T.B.H. (2015). SAMHD1 degradation enhances active suppression of dendritic cell maturation by HIV-1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *194*, 4431–4437.
- Hilkens, C.M.U., Schlaak, J.F., and Kerr, I.M. (2003). Differential responses to IFN-alpha subtypes in human T cells and dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 5255–5263.
- Hillaire, M.L.B., Nieuwkoop, N.J., Boon, A.C.M., de Mutsert, G., Vogelzang-van Trierum, S.E., Fouchier, R.A.M., Osterhaus, A.D.M.E., and Rimmelzwaan, G.F. (2013). Binding of DC-SIGN to the hemagglutinin of influenza A viruses supports virus replication in DC-SIGN expressing cells. *PLoS One* *8*, e56164.
- Hiraragi, H., Kim, S.-J., Phipps, A.J., Silic-Benussi, M., Ciminale, V., Ratner, L., Green, P.L., and Lairmore, M.D. (2006). Human T-lymphotropic virus type 1 mitochondrion-localizing protein p13(II) is required for viral infectivity in vivo. *J. Virol.* *80*, 3469–3476.
- Hishizawa, M., Imada, K., Kitawaki, T., Ueda, M., Kadowaki, N., and Uchiyama, T. (2004). Depletion and impaired interferon-alpha-producing capacity of blood plasmacytoid dendritic cells in human T-cell leukaemia virus type I-infected individuals. *Br. J. Haematol.* *125*, 568–575.
- Hoelzle, M.K., and Svitkina, T. (2012). The cytoskeletal mechanisms of cell–cell junction formation in endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* *23*, 310–323.
- Hyun, J., Ramos, J.C., Toomey, N., Balachandran, S., Lavorgna, A., Harhaj, E., and Barber, G.N. (2015). Oncogenic human T-cell lymphotropic virus type 1 tax suppression of primary innate immune signaling pathways. *J. Virol.* *89*, 4880–4893.
- Idoyaga, J., Fiorese, C., Zbytnuik, L., Lubkin, A., Miller, J., Malissen, B., Mucida, D., Merad, M., and Steinman, R.M. (2013). Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. *J. Clin. Invest.* *123*, 844–854.
- Igakura, T., Stinchcombe, J.C., Goon, P.K.C., Taylor, G.P., Weber, J.N., Griffiths, G.M., Tanaka, Y., Osame, M., and Bangham, C.R.M. (2003). Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* *299*, 1713–1716.
- Ilinskaya, A., Derse, D., Hill, S., Princler, G., and Heidecker, G. (2013). Cell-cell transmission allows human T-lymphotropic virus 1 to circumvent tetherin restriction. *Virology* *436*, 201–209.
- Izquierdo-Useros, N., Lorizate, M., Puertas, M.C., Rodriguez-Plata, M.T., Zangger, N., Erikson, E., Pino, M., Erkizia, I., Glass, B., Clotet, B., et al. (2012). Siglec-1 is a novel dendritic cell receptor that mediates HIV-1 trans-infection through recognition of viral membrane gangliosides. *PLoS Biol.* *10*, e1001448.

- Jain, N., Mathur, N.B., Sharma, V.K., and Dwarkadas, A.M. (1991). Cellular composition including lymphocyte subsets in preterm and full term human colostrum and milk. *Acta Paediatr. Scand.* *80*, 395–399.
- Jain, P., Manuel, S.L., Khan, Z.K., Ahuja, J., Quann, K., and Wigdahl, B. (2009). DC-SIGN mediates cell-free infection and transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 by dendritic cells. *J. Virol.* *83*, 10908–10921.
- Jameson, B., Baribaud, F., Pöhlmann, S., Ghavimi, D., Mortari, F., Doms, R.W., and Iwasaki, A. (2002). Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques. *J. Virol.* *76*, 1866–1875.
- Johnson, J.M., Nicot, C., Fullen, J., Ciminale, V., Casareto, L., Mulloy, J.C., Jacobson, S., and Franchini, G. (2001). Free major histocompatibility complex class I heavy chain is preferentially targeted for degradation by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 p12(I) protein. *J. Virol.* *75*, 6086–6094.
- Johnson, T.R., McLellan, J.S., and Graham, B.S. (2012). Respiratory syncytial virus glycoprotein G interacts with DC-SIGN and L-SIGN to activate ERK1 and ERK2. *J. Virol.* *86*, 1339–1347.
- Johnson-Huang, L.M., McNutt, N.S., Krueger, J.G., and Lowes, M.A. (2009). Cytokine-producing dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory skin diseases. *J. Clin. Immunol.* *29*, 247–256.
- Jones, K.S., Petrow-Sadowski, C., Huang, Y.K., Bertolette, D.C., and Ruscetti, F.W. (2008). Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nat. Med.* *14*, 429–436.
- Jones, K.S., Lambert, S., Bouttier, M., Bénéit, L., Ruscetti, F.W., Hermine, O., and Pique, C. (2011). Molecular aspects of HTLV-1 entry: functional domains of the HTLV-1 surface subunit (SU) and their relationships to the entry receptors. *Viruses* *3*, 794–810.
- Journo, C., Filipe, J., About, F., Chevalier, S.A., Afonso, P.V., Brady, J.N., Flynn, D., Tangy, F., Israël, A., Vidalain, P.-O., et al. (2009). NRP/Optineurin Cooperates with TAX1BP1 to potentiate the activation of NF-kappaB by human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. *PLoS Pathog.* *5*, e1000521.
- Jouve, M., Sol-Foulon, N., Watson, S., Schwartz, O., and Benaroch, P. (2007a). HIV-1 buds and accumulates in “nonacidic” endosomes of macrophages. *Cell Host Microbe* *2*, 85–95.
- Jouve, M., Sol-Foulon, N., Watson, S., Schwartz, O., and Benaroch, P. (2007b). HIV-1 buds and accumulates in “nonacidic” endosomes of macrophages. *Cell Host Microbe* *2*, 85–95.
- Juncà, J., Botín, T., Vila, J., Navarro, J.-T., and Millá, F. (2014). Adult T-cell leukemia/lymphoma with an unusual CD1a positive phenotype. *Cytometry B Clin. Cytom.* *86*, 292–296.
- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R.W., Kastelein, R.A., Bazan, F., and Liu, Y.J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* *194*, 863–869.
- Kakuda, K., Ikematsu, H., Chong, W.L.Y., Hayashi, J., and Kashiwagi, S. (2002). Molecular epidemiology of human T lymphotropic virus type 1 transmission in Okinawa, Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *66*, 404–408.

- Kamga, I., Kahi, S., Develioglu, L., Lichtner, M., Marañón, C., Deveau, C., Meyer, L., Goujard, C., Lebon, P., Sinet, M., et al. (2005). Type I interferon production is profoundly and transiently impaired in primary HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* *192*, 303–310.
- Kannagi, M., Hasegawa, A., Takamori, A., Kinpara, S., and Utsunomiya, A. (2012). The roles of acquired and innate immunity in human T-cell leukemia virus type 1-mediated diseases. *Front. Microbiol.* *3*, 323.
- Kashiwagi, K., Furusyo, N., Nakashima, H., Kubo, N., Kinukawa, N., Kashiwagi, S., and Hayashi, J. (2004). A decrease in mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) in Okinawa, Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *70*, 158–163.
- Kawamura, T. (2011). [Mechanism for HIV invasion via skin or mucosa]. *Uirusu* *61*, 59–65.
- Kawamura, T., Gulden, F.O., Sugaya, M., McNamara, D.T., Borris, D.L., Lederman, M.M., Orenstein, J.M., Zimmerman, P.A., and Blauvelt, A. (2003). R5 HIV productively infects Langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 8401–8406.
- Kayama, H., and Takeda, K. (2016). Regulation of the human gut homeostasis by anti-inflammatory CD14(+) CD163(high) CD160(high) myeloid cells. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* *39*, 441–447.
- Kfoury, Y., Nasr, R., Hermine, O., de Thé, H., and Bazarbachi, A. (2005). Proapoptotic regimes for HTLV-I-transformed cells: targeting Tax and the NF-kappaB pathway. *Cell Death Differ.* *12 Suppl 1*, 871–877.
- Kim, Y.-H., and Lee, J.K. (2017). Histone deacetylase inhibitors suppress immature dendritic cell's migration by regulating CC chemokine receptor 1 expression. *Cell. Immunol.*
- Kissenpfennig, A., Henri, S., Dubois, B., Laplace-Builhé, C., Perrin, P., Romani, N., Tripp, C.H., Douillard, P., Leserman, L., Kaiserlian, D., et al. (2005). Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* *22*, 643–654.
- Klechevsky, E., Morita, R., Liu, M., Cao, Y., Coquery, S., Thompson-Snipes, L., Briere, F., Chaussabel, D., Zurawski, G., Palucka, A.K., et al. (2008). Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity* *29*, 497–510.
- Kovalenko, A., and Wallach, D. (2006). If the prophet does not come to the mountain: dynamics of signaling complexes in NF-kappaB activation. *Mol. Cell* *22*, 433–436.
- Kramer, B., Pelchen-Matthews, A., Deneka, M., Garcia, E., Piguet, V., and Marsh, M. (2005). HIV interaction with endosomes in macrophages and dendritic cells. *Blood Cells. Mol. Dis.* *35*, 136–142.
- Kress, A.K., Kalmer, M., Rowan, A.G., Grassmann, R., and Fleckenstein, B. (2011). The tumor marker Fascin is strongly induced by the Tax oncoprotein of HTLV-1 through NF- B signals. *Blood* *117*, 3609–3612.
- Kwon, D.S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W.A., and Littman, D.R. (2002). DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* *16*, 135–144.

- Kwon, S.-Y., Lim, A.H., Park, J.Y., Han, S.H., and Cho, N.-S. (2008). Seroprevalence of human T-lymphotropic virus type 1 and 2 in Korean blood donors. *J. Med. Virol.* *80*, 1864–1867.
- Laguette, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Ségéral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., and Benkirane, M. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* *474*, 654–657.
- Lairmore, M.D., Haines, R., and Anupam, R. (2012). Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease. *Curr. Opin. Virol.* *2*, 474–481.
- Lapenta, C., Santini, S.M., Logozzi, M., Spada, M., Andreotti, M., Di Pucchio, T., Parlato, S., and Belardelli, F. (2003). Potent immune response against HIV-1 and protection from virus challenge in hu-PBL-SCID mice immunized with inactivated virus-pulsed dendritic cells generated in the presence of IFN-alpha. *J. Exp. Med.* *198*, 361–367.
- Lapenta, C., Santini, S.M., Spada, M., Donati, S., Urbani, F., Accapezzato, D., Franceschini, D., Andreotti, M., Barnaba, V., and Belardelli, F. (2006). IFN-alpha-conditioned dendritic cells are highly efficient in inducing cross-priming CD8(+) T cells against exogenous viral antigens. *Eur. J. Immunol.* *36*, 2046–2060.
- Laperche, S., Worms, B., Pilonel, J., European Network of Transfusion Medicine Societies, and Steering Committee (2009). Blood safety strategies for human T-cell lymphotropic virus in Europe. *Vox Sang.* *96*, 104–110.
- Larrea, E., Riezu-Boj, J.I., Gil-Guerrero, L., Casares, N., Aldabe, R., Sarobe, P., Civeira, M.P., Heeney, J.L., Rollier, C., Verstrepen, B., et al. (2007). Upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatitis C virus infection. *J. Virol.* *81*, 3662–3666.
- Lauterbach, H., Bathke, B., Gilles, S., Traidl-Hoffmann, C., Lubber, C.A., Fejer, G., Freudenberg, M.A., Davey, G.M., Vremec, D., Kallies, A., et al. (2010). Mouse CD8alpha+ DCs and human BDCA3+ DCs are major producers of IFN-lambda in response to poly IC. *J. Exp. Med.* *207*, 2703–2717.
- Lavender, K.J., Gibbert, K., Peterson, K.E., Van Dis, E., Francois, S., Woods, T., Messer, R.J., Gawanbacht, A., Müller, J.A., Münch, J., et al. (2016). Interferon Alpha Subtype-Specific Suppression of HIV-1 Infection In Vivo. *J. Virol.* *90*, 6001–6013.
- Le Bon, A., Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., Borrow, P., and Tough, D.F. (2003). Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat. Immunol.* *4*, 1009–1015.
- Le Hesran, J.Y., Delaporte, E., Gaudebout, C., Trebuck, A., Schrijvers, D., Josse, R., Peeters, M., Cheringou, H., Dupont, A., and Larouze, B. (1994). Demographic factors associated with HTLV-1 infection in a Gabonese community. *Int. J. Epidemiol.* *23*, 812–817.
- Le Nouën, C., Hillyer, P., Brock, L.G., Winter, C.C., Rabin, R.L., Collins, P.L., and Buchholz, U.J. (2014). Human metapneumovirus SH and G glycoproteins inhibit macropinocytosis-mediated entry into human dendritic cells and reduce CD4+ T cell activation. *J. Virol.* *88*, 6453–6469.
- Lee, J., Breton, G., Oliveira, T.Y.K., Zhou, Y.J., Aljoufi, A., Pühr, S., Cameron, M.J., Sékaly, R.-P., Nussenzweig, M.C., and Liu, K. (2015). Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow. *J. Exp. Med.* *212*, 385–399.

- Legitimo, A., Consolini, R., Failli, A., Orsini, G., and Spisni, R. (2014). Dendritic cell defects in the colorectal cancer. *Hum. Vaccines Immunother.* *10*, 3224–3235.
- Lehky, T.J., Fox, C.H., Koenig, S., Levin, M.C., Flerlage, N., Izumo, S., Sato, E., Raine, C.S., Osame, M., and Jacobson, S. (1995). Detection of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax RNA in the central nervous system of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by in situ hybridization. *Ann. Neurol.* *37*, 167–175.
- Letko, M., Boorman, T., Kootstra, N., Simon, V., and Ooms, M. (2015). Identification of the HIV-1 Vif and Human APOBEC3G Protein Interface. *Cell Rep.* *13*, 1789–1799.
- Leung, D.W., Prins, K.C., Basler, C.F., and Amarasinghe, G.K. (2010). Ebola virus VP35 is a multifunctional virulence factor. *Virulence* *1*, 526–531.
- Levin, M.C., and Jacobson, S. (1997). HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): a chronic progressive neurologic disease associated with immunologically mediated damage to the central nervous system. *J. Neurovirol.* *3*, 126–140.
- Levin, M.C., Lee, S.M., Kalume, F., Morcos, Y., Dohan, F.C., Hasty, K.A., Callaway, J.C., Zunt, J., Desiderio, D., and Stuart, J.M. (2002). Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. *Nat. Med.* *8*, 509–513.
- Li, H.-C., Biggar, R.J., Miley, W.J., Maloney, E.M., Cranston, B., Hanchard, B., and Hisada, M. (2004). Provirus load in breast milk and risk of mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type I. *J. Infect. Dis.* *190*, 1275–1278.
- Liberatore, R.A., Mastrocola, E.J., Powell, C., and Bieniasz, P.D. (2017). Tetherin Inhibits Cell-free Virus Dissemination and Retards Murine Leukemia Virus Pathogenesis. *J. Virol.*
- Logue, E.C., and Sha, W.C. (2004). CD28-B7 bidirectional signaling: a two-way street to activation. *Nat. Immunol.* *5*, 1103–1105.
- Lozach, P.-Y., Lortat-Jacob, H., de Lacroix de Lavalette, A., Staropoli, I., Fong, S., Amara, A., Houles, C., Fieschi, F., Schwartz, O., Virelizier, J.-L., et al. (2003). DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J. Biol. Chem.* *278*, 20358–20366.
- Lozach, P.-Y., Burleigh, L., Staropoli, I., Navarro-Sanchez, E., Harriague, J., Virelizier, J.-L., Rey, F.A., Desprès, P., Arenzana-Seisdedos, F., and Amara, A. (2005). Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J. Biol. Chem.* *280*, 23698–23708.
- Lozach, P.-Y., Kühbacher, A., Meier, R., Mancini, R., Bitto, D., Bouloy, M., and Helenius, A. (2011a). DC-SIGN as a receptor for phleboviruses. *Cell Host Microbe* *10*, 75–88.
- Lozach, P.-Y., Kühbacher, A., Meier, R., Mancini, R., Bitto, D., Bouloy, M., and Helenius, A. (2011b). DC-SIGN as a receptor for phleboviruses. *Cell Host Microbe* *10*, 75–88.

Ludwig, I.S., Lekkerkerker, A.N., Depla, E., Bosman, F., Musters, R.J.P., Depraetere, S., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B.H. (2004). Hepatitis C virus targets DC-SIGN and L-SIGN to escape lysosomal degradation. *J. Virol.* *78*, 8322–8332.

Ma, Y., Zhang, B., Wang, D., Qian, L., Song, X., Wang, X., Yang, C., and Zhao, G. (2017). HTLV-1 basic leucine zipper factor downregulates cyclin D1 expression via interactions with NF- $\kappa$ B. *Int. J. Mol. Med.*

Macal, M., Lewis, G.M., Kunz, S., Flavell, R., Harker, J.A., and Zúñiga, E.I. (2012). Plasmacytoid dendritic cells are productively infected and activated through TLR-7 early after arenavirus infection. *Cell Host Microbe* *11*, 617–630.

Mahieux, R., and Gessain, A. (2007). Adult T-cell leukemia/lymphoma and HTLV-1. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* *2*, 257–264.

Mahieux, R., Suspène, R., Delebecque, F., Henry, M., Schwartz, O., Wain-Hobson, S., and Vartanian, J.-P. (2005). Extensive editing of a small fraction of human T-cell leukemia virus type 1 genomes by four APOBEC3 cytidine deaminases. *J. Gen. Virol.* *86*, 2489–2494.

Mahnke, K., Guo, M., Lee, S., Sepulveda, H., Swain, S.L., Nussenzweig, M., and Steinman, R.M. (2000). The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J. Cell Biol.* *151*, 673–684.

Makino, M., Wakamatsu, S., Shimokubo, S., Arima, N., and Baba, M. (2000). Production of functionally deficient dendritic cells from HTLV-I-infected monocytes: implications for the dendritic cell defect in adult T cell leukemia. *Virology* *274*, 140–148.

Makino, M., Utsunomiya, A., Maeda, Y., Shimokubo, S., Izumo, S., and Baba, M. (2001). Association of CD40 ligand expression on HTLV-I-infected T cells and maturation of dendritic cells. *Scand. J. Immunol.* *54*, 574–581.

Malinova, D., Fritzsche, M., Nowosad, C.R., Armer, H., Munro, P.M.G., Blundell, M.P., Charras, G., Tolar, P., Bouma, G., and Thrasher, A.J. (2016). WASp-dependent actin cytoskeleton stability at the dendritic cell immunological synapse is required for extensive, functional T cell contacts. *J. Leukoc. Biol.* *99*, 699–710.

Malissen, B., Tamoutounour, S., and Henri, S. (2014). The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 417–428.

Manches, O., Munn, D., Fallahi, A., Lifson, J., Chaperot, L., Plumas, J., and Bhardwaj, N. (2008). HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* *118*, 3431–3439.

Mandl, J.N., Barry, A.P., Vanderford, T.H., Kozyr, N., Chavan, R., Klucking, S., Barrat, F.J., Coffman, R.L., Staprans, S.I., and Feinberg, M.B. (2008). Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections. *Nat. Med.* *14*, 1077–1087.

Manel, N., Battini, J.-L., and Sitbon, M. (2005). Human T cell leukemia virus envelope binding and virus entry are mediated by distinct domains of the glucose transporter GLUT1. *J. Biol. Chem.* *280*, 29025–29029.



- Manivannan, K., Rowan, A.G., Tanaka, Y., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2016). CADM1/TSLC1 Identifies HTLV-1-Infected Cells and Determines Their Susceptibility to CTL-Mediated Lysis. *PLoS Pathog.* *12*, e1005560.
- Manns, A., Wilks, R.J., Murphy, E.L., Haynes, G., Figueroa, J.P., Barnett, M., Hanchard, B., and Blattner, W.A. (1992). A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. *Int. J. Cancer* *51*, 886–891.
- Marois, I., Cloutier, A., Meunier, I., Weingartl, H.M., Cantin, A.M., and Richter, M.V. (2014). Inhibition of influenza virus replication by targeting broad host cell pathways. *PLoS One* *9*, e110631.
- Marsh, M., and Helenius, A. (2006). Virus entry: open sesame. *Cell* *124*, 729–740.
- Martin-Latil, S., Gnädig, N.F., Mallet, A., Desdouits, M., Guivel-Benhassine, F., Jeannin, P., Prevost, M.-C., Schwartz, O., Gessain, A., Ozden, S., et al. (2012). Transcytosis of HTLV-1 across a tight human epithelial barrier and infection of subepithelial dendritic cells. *Blood* *120*, 572–580.
- Martins, M.L., Guimarães, J.C., Ribas, J.G., Romanelli, L.C.F., and de Freitas Carneiro-Proietti, A.B. (2017). Long-term follow-up of HTLV-1 proviral load in asymptomatic carriers and in incident cases of HAM/TSP: what is its relevance as a prognostic marker for neurologic disease? *J. Neurovirol.* *23*, 125–133.
- Marukian, S., Jones, C.T., Andrus, L., Evans, M.J., Ritola, K.D., Charles, E.D., Rice, C.M., and Dustin, L.B. (2008). Cell culture-produced hepatitis C virus does not infect peripheral blood mononuclear cells. *Hepatology*. *Baltimore, Md* *48*, 1843–1850.
- Maruyama, M., Shibuya, H., Harada, H., Hatakeyama, M., Seiki, M., Fujita, T., Inoue, J., Yoshida, M., and Taniguchi, T. (1987). Evidence for aberrant activation of the interleukin-2 autocrine loop by HTLV-1-encoded p40x and T3/Ti complex triggering. *Cell* *48*, 343–350.
- Marzi, A., Gramberg, T., Simmons, G., Möller, P., Rennekamp, A.J., Krumbiegel, M., Geier, M., Eisemann, J., Turza, N., Saunier, B., et al. (2004). DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* *78*, 12090–12095.
- Matsui, M., and Kuroda, Y. (1997). Aberrant immunity in the central nervous system in relation to disease progression in HAM/TSP. *Clin. Immunol. Immunopathol.* *82*, 203–206.
- Matsui, T., Connolly, J.E., Michnevitz, M., Chaussabel, D., Yu, C.-I., Glaser, C., Tindle, S., Pypaert, M., Freitas, H., Piqueras, B., et al. (2009). CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J. Immunol. Baltimore, Md* *182*, 6815–6823.
- Mazurov, D., Heidecker, G., and Derse, D. (2006). HTLV-1 Gag protein associates with CD82 tetraspanin microdomains at the plasma membrane. *Virology* *346*, 194–204.
- Mazurov, D., Ilinskaya, A., Heidecker, G., Lloyd, P., and Derse, D. (2010). Quantitative Comparison of HTLV-1 and HIV-1 Cell-to-Cell Infection with New Replication Dependent Vectors. *PLoS Pathog.* *6*, e1000788.
- McDonald, D., Wu, L., Bohks, S.M., KewalRamani, V.N., Unutmaz, D., and Hope, T.J. (2003). Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* *300*, 1295–1297.

- McIlroy, D., Autran, B., Cheynier, R., Wain-Hobson, S., Clauvel, J.P., Oksenhendler, E., Debré, P., and Hosmalin, A. (1995). Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *J. Virol.* *69*, 4737–4745.
- Melkus, M.W., Estes, J.D., Padgett-Thomas, A., Gatlin, J., Denton, P.W., Othieno, F.A., Wege, A.K., Haase, A.T., and Garcia, J.V. (2006). Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1. *Nat. Med.* *12*, 1316–1322.
- Mellor, A.L., and Munn, D.H. (2004). IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 762–774.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 563–604.
- Mesman, A.W., Zijlstra-Willems, E.M., Kaptein, T.M., de Swart, R.L., Davis, M.E., Ludlow, M., Duprex, W.P., Gack, M.U., Gringhuis, S.I., and Geijtenbeek, T.B.H. (2014). Measles virus suppresses RIG-I-like receptor activation in dendritic cells via DC-SIGN-mediated inhibition of PP1 phosphatases. *Cell Host Microbe* *16*, 31–42.
- Michea, P., Vargas, P., Donnadieu, M.-H., Roseblatt, M., Bono, M.R., Duménil, G., and Soumelis, V. (2013). Epithelial control of the human pDC response to extracellular bacteria. *Eur. J. Immunol.* *43*, 1264–1273.
- Miyauchi, K., Kim, Y., Latinovic, O., Morozov, V., and Melikyan, G.B. (2009). HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell* *137*, 433–444.
- Mizuguchi, M., Asao, H., Hara, T., Higuchi, M., Fujii, M., and Nakamura, M. (2009). Transcriptional activation of the interleukin-21 gene and its receptor gene by human T-cell leukemia virus type 1 Tax in human T-cells. *J. Biol. Chem.* *284*, 25501–25511.
- Moghaddami, M., James, M., Whittle, S.L., and Cleland, L.G. (2014). Synovial fluid myeloid dendritic cells display important differences compared to monocyte-derived dendritic cells prepared in vitro. *Clin. Transl. Immunol.* *3*, e23.
- Mohr, C.F., Kalmer, M., Gross, C., Mann, M.C., Sterz, K.R., Kieser, A., Fleckenstein, B., and Kress, A.K. (2014). The tumor marker Fascin is induced by the Epstein-Barr virus-encoded oncoprotein LMP1 via NF- $\kappa$ B in lymphocytes and contributes to their invasive migration. *Cell Commun. Signal.* *12*, 1.
- Mohr, C.F., Gross, C., Bros, M., Reske-Kunz, A.B., Biesinger, B., and Thoma-Kress, A.K. (2015). Regulation of the tumor marker Fascin by the viral oncoprotein Tax of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) depends on promoter activation and on a promoter-independent mechanism. *Virology* *485*, 481–491.
- van der Molen, R.G., Sprengers, D., Binda, R.S., de Jong, E.C., Niesters, H.G.M., Kusters, J.G., Kwekkeboom, J., and Janssen, H.L.A. (2004). Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B. *Hepatol. Baltim. Md* *40*, 738–746.

van der Molen, R.G., Sprengers, D., Biesta, P.J., Kusters, J.G., and Janssen, H.L.A. (2006a). Favorable effect of adefovir on the number and functionality of myeloid dendritic cells of patients with chronic HBV. *Hepatology*. Baltimore, Md 44, 907–914.

van der Molen, R.G., Sprengers, D., Biesta, P.J., Kusters, J.G., and Janssen, H.L.A. (2006b). Favorable effect of adefovir on the number and functionality of myeloid dendritic cells of patients with chronic HBV. *Hepatology*. Baltimore, Md 44, 907–914.

Moore, G.R., Traugott, U., Scheinberg, L.C., and Raine, C.S. (1989). Tropical spastic paraparesis: a model of virus-induced, cytotoxic T-cell-mediated demyelination? *Ann. Neurol.* 26, 523–530.

Moriuchi, H., Masuzaki, H., Doi, H., and Katamine, S. (2013). Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 32, 175–177.

Mostoller, K., Norbury, C.C., Jain, P., and Wigdahl, B. (2004). Human T-cell leukemia virus type I Tax induces the expression of dendritic cell markers associated with maturation and activation. *J. Neurovirol.* 10, 358–371.

Munn, D.H., Shafizadeh, E., Attwood, J.T., Bondarev, I., Pashine, A., and Mellor, A.L. (1999). Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J. Exp. Med.* 189, 1363–1372.

Murphy, E.L., Hanchard, B., Figueroa, J.P., Gibbs, W.N., Lofters, W.S., Campbell, M., Goedert, J.J., and Blattner, W.A. (1989a). Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. *Int. J. Cancer* 43, 250–253.

Murphy, E.L., Figueroa, J.P., Gibbs, W.N., Brathwaite, A., Holding-Cobham, M., Waters, D., Cranston, B., Hanchard, B., and Blattner, W.A. (1989b). Sexual transmission of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Ann. Intern. Med.* 111, 555–560.

Murphy, E.L., Figueroa, J.P., Gibbs, W.N., Holding-Cobham, M., Cranston, B., Malley, K., Bodner, A.J., Alexander, S.S., and Blattner, W.A. (1991). Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroprevalence in Jamaica. I. Demographic determinants. *Am. J. Epidemiol.* 133, 1114–1124.

Nagai, M., Usuku, K., Matsumoto, W., Kodama, D., Takenouchi, N., Moritoyo, T., Hashiguchi, S., Ichinose, M., Bangham, C.R., Izumo, S., et al. (1998). Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J. Neurovirol.* 4, 586–593.

Nakano, K., and Watanabe, T. (2012). HTLV-1 Rex: the courier of viral messages making use of the host vehicle. *Front. Microbiol.* 3, 330.

Naranjo-Gómez, M., Raich-Regué, D., Oñate, C., Grau-López, L., Ramo-Tello, C., Pujol-Borrell, R., Martínez-Cáceres, E., and Borràs, F.E. (2011). Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells. *J. Transl. Med.* 9, 89.

Nascimento, C.R., Lima, M.A., de Andrada Serpa, M.J., Espindola, O., Leite, A.C.C., and Echevarria-Lima, J. (2011). Monocytes from HTLV-1-infected patients are unable to fully mature into dendritic cells. *Blood* 117, 489–499.

Nasr, R., Marçais, A., Hermine, O., and Bazarbachi, A. (2017). Overview of Targeted Therapies for Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1582, 197–216.

Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J.-L., Arenzana-Seisdedos, F., and Després, P. (2003). Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* 4, 723–728.

Navas, M.-C., Fuchs, A., Schvoerer, E., Bohbot, A., Aubertin, A.-M., and Stoll-Keller, F. (2002). Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection. *J. Med. Virol.* 67, 152–161.

Nejmeddine, M., Negi, V.S., Mukherjee, S., Tanaka, Y., Orth, K., Taylor, G.P., and Bangham, C.R. (2009). HTLV-1–Tax and ICAM-1 act on T-cell signal pathways to polarize the microtubule-organizing center at the virological synapse. *Blood* 114, 1016–1025.

Nerome, Y., Kojyo, K., Ninomiya, Y., Ishikawa, T., Ogiso, A., Takei, S., Kawano, Y., Douchi, T., Takezaki, T., and Owaki, T. (2014). Current human T-cell lymphotropic virus type 1 mother-to-child transmission prevention status in Kagoshima. *Pediatr. Int. Off. J. Jpn. Pediatr. Soc.* 56, 640–643.

Nice, T.J., Baldrige, M.T., McCune, B.T., Norman, J.M., Lazear, H.M., Artyomov, M., Diamond, M.S., and Virgin, H.W. (2015). Interferon- $\lambda$  cures persistent murine norovirus infection in the absence of adaptive immunity. *Science* 347, 269–273.

Nicot, C., Dunder, M., Johnson, J.M., Fullen, J.R., Alonzo, N., Fukumoto, R., Princler, G.L., Derse, D., Misteli, T., and Franchini, G. (2004). HTLV-1-encoded p30II is a post-transcriptional negative regulator of viral replication. *Nat. Med.* 10, 197–201.

Nobile, C., Moris, A., Porrot, F., Sol-Foulon, N., and Schwartz, O. (2003). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated fusion by DC-SIGN. *J. Virol.* 77, 5313–5323.

Nobile, C., Petit, C., Moris, A., Skrabal, K., Abastado, J.-P., Mammano, F., and Schwartz, O. (2005). Covert human immunodeficiency virus replication in dendritic cells and in DC-SIGN-expressing cells promotes long-term transmission to lymphocytes. *J. Virol.* 79, 5386–5399.

Nozuma, S., Matsuura, E., Kodama, D., Tashiro, Y., Matsuzaki, T., Kubota, R., Izumo, S., and Takashima, H. (2017). Effects of host restriction factors and the HTLV-1 subtype on susceptibility to HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Retrovirology* 14, 26.

Nunes, D., Boa-Sorte, N., Grassi, M.F.R., Taylor, G.P., Teixeira, M.G., Barreto, M.L., Dourado, I., and Galvão-Castro, B. (2017). HTLV-1 is predominantly sexually transmitted in Salvador, the city with the highest HTLV-1 prevalence in Brazil. *PLoS One* 12, e0171303.

Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., Hintzen, G., Kiefard, Z., Zwirner, J., Blankenstein, T., Henning, G., and Förster, R. (2004). CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* 21, 279–288.

Ohtani, T., Mizuashi, M., Nakagawa, S., Sasaki, Y., Fujimura, T., Okuyama, R., and Aiba, S. (2009). TGF- $\beta$ 1 dampens the susceptibility of dendritic cells to environmental stimulation, leading to the requirement for danger signals for activation. *Immunology* 126, 485–499.

- O’Keeffe, M., Mok, W.H., and Radford, K.J. (2015). Human dendritic cell subsets and function in health and disease. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 72, 4309–4325.
- Oot, R.A., Couoh-Cardel, S., Sharma, S., Stam, N.J., and Wilkens, S. (2017). Breaking up and making up: The secret life of the vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.*
- Osame, M., Usuku, K., Izumo, S., Ijichi, N., Amitani, H., Igata, A., Matsumoto, M., and Tara, M. (1986). HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet Lond. Engl.* 1, 1031–1032.
- Osame, M., Janssen, R., Kubota, H., Nishitani, H., Igata, A., Nagataki, S., Mori, M., Goto, I., Shimabukuro, H., and Khabbaz, R. (1990). Nationwide survey of HTLV-I-associated myelopathy in Japan: association with blood transfusion. *Ann. Neurol.* 28, 50–56.
- Otani, T., Ogura, Y., Misaki, K., Maeda, T., Kimpara, A., Yonemura, S., and Hayashi, S. (2016). IKK $\epsilon$  inhibits PKC to promote Fascin-dependent actin bundling. *Development* 143, 3806–3816.
- Oteiza, A., and Mechti, N. (2011). The human T-cell leukemia virus type 1 oncoprotein tax controls forkhead box O4 activity through degradation by the proteasome. *J. Virol.* 85, 6480–6491.
- Ozden, S., Cochet, M., Mikol, J., Teixeira, A., Gessain, A., and Pique, C. (2004). Direct evidence for a chronic CD8<sup>+</sup>-T-cell-mediated immune reaction to tax within the muscle of a human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1-infected patient with sporadic inclusion body myositis. *J. Virol.* 78, 10320–10327.
- Pais-Correia, A.-M., Sachse, M., Guadagnini, S., Robbiati, V., Lasserre, R., Gessain, A., Gout, O., Alcover, A., and Thoulouze, M.-I. (2010). Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat. Med.* 16, 83–89.
- Pavlovic, J., Zürcher, T., Haller, O., and Staeheli, P. (1990). Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *J. Virol.* 64, 3370–3375.
- Percher, F., Jeannin, P., Martin-Latil, S., Gessain, A., Afonso, P.V., Vidy-Roche, A., and Ceccaldi, P.-E. (2016). Mother-to-Child Transmission of HTLV-1 Epidemiological Aspects, Mechanisms and Determinants of Mother-to-Child Transmission. *Viruses* 8.
- Pérès, E., Bagdassarian, E., This, S., Villaudy, J., Rigal, D., Gazzolo, L., and Duc Dodon, M. (2015). From Immunodeficiency to Humanization: The Contribution of Mouse Models to Explore HTLV-1 Leukemogenesis. *Viruses* 7, 6371–6386.
- Perini, G., Wagner, S., and Green, M.R. (1995). Recognition of bZIP proteins by the human T-cell leukaemia virus transactivator Tax. *Nature* 376, 602–605.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grässer, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C., et al. (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304, 734–736.
- Pique, C., and Jones, K.S. (2012). Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Front. Microbiol.* 3, 378.

Pique, C., Lagaudrière-Gesbert, C., Delamarre, L., Rosenberg, A.R., Conjeaud, H., and Dokh lar, M.C. (2000). Interaction of CD82 tetraspanin proteins with HTLV-1 envelope glycoproteins inhibits cell-to-cell fusion and virus transmission. *Virology* 276, 455–465.

Pisani, P., Parkin, D.M., Muñoz, N., and Ferlay, J. (1997). Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 6, 387–400.

Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D., and Gallo, R.C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 7415–7419.

Polak, M.E., Newell, L., Taraban, V.Y., Pickard, C., Healy, E., Friedmann, P.S., Al-Shamkhani, A., and Ardern-Jones, M.R. (2012). CD70-CD27 interaction augments CD8+ T-cell activation by human epidermal Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 132, 1636–1644.

Popovic, M., Reitz, M.S., Sarngadharan, M.G., Robert-Guroff, M., Kalyanaraman, V.S., Nakao, Y., Miyoshi, I., Minowada, J., Yoshida, M., Ito, Y., et al. (1982). The virus of Japanese adult T-cell leukaemia is a member of the human T-cell leukaemia virus group. *Nature* 300, 63–66.

Proietto, A.I., Mittag, D., Roberts, A.W., Sprigg, N., and Wu, L. (2012). The equivalents of human blood and spleen dendritic cell subtypes can be generated in vitro from human CD34(+) stem cells in the presence of fms-like tyrosine kinase 3 ligand and thrombopoietin. *Cell. Mol. Immunol.* 9, 446–454.

Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H.S., Lewis, K.L., and Sisirak, V. (2011). Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 163–183.

Relloso, M., Puig-Kr ger, A., Pello, O.M., Rodríguez-Fernández, J.L., de la Rosa, G., Longo, N., Navarro, J., Muñoz-Fernández, M.A., Sánchez-Mateos, P., and Corb , A.L. (2002). DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 168, 2634–2643.

Ribeiro, C.M.S., Sarrami-Forooshani, R., Setiawan, L.C., Zijlstra-Willems, E.M., van Hamme, J.L., Tigchelaar, W., van der Wel, N.N., Kootstra, N.A., Gringhuis, S.I., and Geijtenbeek, T.B.H. (2016). Receptor usage dictates HIV-1 restriction by human TRIM5  in dendritic cell subsets. *Nature* 540, 448–452.

Riegler, S., Hebart, H., Einsele, H., Brossart, P., Jahn, G., and Sinzger, C. (2000). Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 81, 393–399.

Rizkallah, G., Mahieux, R., and Dutartre, H. (2015). [Intercellular transmission of HTLV-1: not all mechanisms have been revealed]. *Med. Sci. MS* 31, 629–637.

Sadler, A.J., and Williams, B.R.G. (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 559–568.

- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* *179*, 1109–1118.
- Sanders, R.W., de Jong, E.C., Baldwin, C.E., Schuitemaker, J.H.N., Kapsenberg, M.L., and Berkhout, B. (2002). Differential transmission of human immunodeficiency virus type 1 by distinct subsets of effector dendritic cells. *J. Virol.* *76*, 7812–7821.
- Sandgren, K.J., Wilkinson, J., Miranda-Saksena, M., McInerney, G.M., Byth-Wilson, K., Robinson, P.J., and Cunningham, A.L. (2010). A differential role for macropinocytosis in mediating entry of the two forms of vaccinia virus into dendritic cells. *PLoS Pathog.* *6*, e1000866.
- Sasada, A., Takaori-Kondo, A., Shirakawa, K., Kobayashi, M., Abudu, A., Hishizawa, M., Imada, K., Tanaka, Y., and Uchiyama, T. (2005). APOBEC3G targets human T-cell leukemia virus type 1. *Retrovirology* *2*, 32.
- Satake, M., Yamada, Y., Atogami, S., and Yamaguchi, K. (2015). The incidence of adult T-cell leukemia/lymphoma among human T-lymphotropic virus type 1 carriers in Japan. *Leuk. Lymphoma* *56*, 1806–1812.
- Satake, M., Iwanaga, M., Sagara, Y., Watanabe, T., Okuma, K., and Hamaguchi, I. (2016). Incidence of human T-lymphotropic virus 1 infection in adolescent and adult blood donors in Japan: a nationwide retrospective cohort analysis. *Lancet Infect. Dis.*
- Sathish, N., Zhu, F.X., and Yuan, Y. (2009). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF45 interacts with kinesin-2 transporting viral capsid-tegument complexes along microtubules. *PLoS Pathog.* *5*, e1000332.
- Sato, K., Honda, S.-I., Shibuya, A., and Shibuya, K. (2016). Improved protocol for the isolation of naïve follicular dendritic cells. *Mol. Immunol.* *78*, 140–145.
- Sato, T., Kitawaki, T., Fujita, H., Iwata, M., Iyoda, T., Inaba, K., Ohteki, T., Hasegawa, S., Kawada, K., Sakai, Y., et al. (2013). Human CD1c<sup>+</sup> myeloid dendritic cells acquire a high level of retinoic acid-producing capacity in response to vitamin D<sub>3</sub>. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *191*, 3152–3160.
- Satou, Y., Yasunaga, J., Yoshida, M., and Matsuoka, M. (2006). HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 720–725.
- Satpathy, A.T., Wu, X., Albring, J.C., and Murphy, K.M. (2012). Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat. Immunol.* *13*, 1145–1154.
- Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guermonprez, P., Vargas, P., Moura, I.C., Lennon-Duménil, A.-M., Seabra, M.C., Raposo, G., and Amigorena, S. (2006). NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* *126*, 205–218.
- Savina, A., Peres, A., Cebrian, I., Carmo, N., Moita, C., Hacohen, N., Moita, L.F., and Amigorena, S. (2009). The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalization and antigen crosspresentation selectively in CD8(+) dendritic cells. *Immunity* *30*, 544–555.

Schäfer, C., Born, S., Möhl, C., Houben, S., Kirchgeßner, N., Merkel, R., and Hoffmann, B. (2010). The key feature for early migratory processes: Dependence of adhesion, actin bundles, force generation and transmission on filopodia. *Cell Adhes. Migr.* 4, 215–225.

Schmid, D., Pypaert, M., and Münz, C. (2007). Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* 26, 79–92.

Schoenberger, S.P., Toes, R.E., van der Voort, E.I., Ofringa, R., and Melief, C.J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393, 480–483.

Schrøder, M., Melum, G.R., Landsverk, O.J.B., Bujko, A., Yaqub, S., Gran, E., Aamodt, H., Bækkevold, E.S., Jahnsen, F.L., and Richter, L. (2016). CD1c-Expression by Monocytes - Implications for the Use of Commercial CD1c+ Dendritic Cell Isolation Kits. *PloS One* 11, e0157387.

Schulte, B.M., Kers-Rebel, E.D., Prosser, A.C., Galama, J.M.D., van Kuppeveld, F.J.M., and Adema, G.J. (2013). Differential susceptibility and response of primary human myeloid BDCA1(+) dendritic cells to infection with different Enteroviruses. *PloS One* 8, e62502.

Schwartz, O., Maréchal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F., and Heard, J.M. (1996). Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat. Med.* 2, 338–342.

Scutera, S., Fraone, T., Musso, T., Cappello, P., Rossi, S., Pierobon, D., Orinska, Z., Paus, R., Bulfone-Paus, S., and Giovarelli, M. (2009). Survival and migration of human dendritic cells are regulated by an IFN- $\alpha$ -inducible Axl/Gas6 pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 3004–3013.

Segal, A.W. (2006). How superoxide production by neutrophil leukocytes kills microbes. *Novartis Found. Symp.* 279, 92-98; discussion 98-100, 216–219.

Shimoyama, M. (1991). Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br. J. Haematol.* 79, 428–437.

Shultz, L.D., Saito, Y., Najima, Y., Tanaka, S., Ochi, T., Tomizawa, M., Doi, T., Sone, A., Suzuki, N., Fujiwara, H., et al. (2010). Generation of functional human T-cell subsets with HLA-restricted immune responses in HLA class I expressing NOD/SCID/IL2r gamma(null) humanized mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 13022–13027.

Sibon, D., Cassar, O., Duga, I., Brouzes, C., Ghez, D., Pasquier, C., Sibon, C., Desrames, A., Mortreux, F., Wattel, E., et al. (2015). Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma in a Caucasian Patient After Sexual Transmission of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1. *Open Forum Infect. Dis.* 2, ofv032.

Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835–1837.

Silbermann, K., Schneider, G., and Grassmann, R. (2008). Stimulation of interleukin-13 expression by human T-cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax via a dually active promoter element responsive to NF- $\kappa$ B and NFAT. *J. Gen. Virol.* 89, 2788–2798.



- Silverman, L.R., Phipps, A.J., Montgomery, A., Ratner, L., and Lairmore, M.D. (2004). Human T-cell lymphotropic virus type 1 open reading frame II-encoded p30II is required for in vivo replication: evidence of in vivo reversion. *J. Virol.* *78*, 3837–3845.
- Simmons, G., Reeves, J.D., Grogan, C.C., Vandenberghe, L.H., Baribaud, F., Whitbeck, J.C., Burke, E., Buchmeier, M.J., Soilleux, E.J., Riley, J.L., et al. (2003). DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. *Virology* *305*, 115–123.
- Singh, R. (2016). Central role of PI3K-SYK interaction in fibrinogen-induced lamellipodia and filopodia formation in platelets. *FEBS Open Bio* *6*, 1285–1296.
- Smed-Sörensen, A., Loré, K., Vasudevan, J., Louder, M.K., Andersson, J., Mascola, J.R., Spetz, A.-L., and Koup, R.A. (2005). Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J. Virol.* *79*, 8861–8869.
- Sobata, R., Matsumoto, C., Uchida, S., Suzuki, Y., Satake, M., and Tadokoro, K. (2015). Estimation of the infectious viral load required for transfusion-transmitted human T-lymphotropic virus type 1 infection (TT-HTLV-1) and of the effectiveness of leukocyte reduction in preventing TT-HTLV-1. *Vox Sang.* *109*, 122–128.
- Sodeik, B., Ebersold, M.W., and Helenius, A. (1997). Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell Biol.* *136*, 1007–1021.
- Song, Y., Shi, M.-M., Zhang, Y.-Y., Mo, X.-D., Wang, Y., Zhang, X.-H., Xu, L.-P., Huang, X.-J., and Kong, Y. (2017). Abnormalities of the Bone Marrow Immune Microenvironment in Patients with Prolonged Isolated Thrombocytopenia after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.*
- Southern, S.O., and Southern, P.J. (1998). Persistent HTLV-I infection of breast luminal epithelial cells: a role in HTLV transmission? *Virology* *241*, 200–214.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* *137*, 1142–1162.
- Steinman, R.M., and Hemmi, H. (2006). Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *311*, 17–58.
- Steinman, R.M., Turley, S., Mellman, I., and Inaba, K. (2000). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* *191*, 411–416.
- Sugata, K., Satou, Y., Yasunaga, J., Hara, H., Ohshima, K., Utsunomiya, A., Mitsuyama, M., and Matsuoka, M. (2012). HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines. *Blood* *119*, 434–444.
- Sugimoto, N., Takuwa, N., Okamoto, H., Sakurada, S., and Takuwa, Y. (2003). Inhibitory and stimulatory regulation of Rac and cell motility by the G12/13-Rho and Gi pathways integrated downstream of a single G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor isoform. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 1534–1545.

- Svajger, U., Anderluh, M., Jeras, M., and Obermajer, N. (2010). C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cell. Signal.* *22*, 1397–1405.
- Sze, A., Belgnaoui, S.M., Olagnier, D., Lin, R., Hiscott, J., and van Grevenynghe, J. (2013). Host restriction factor SAMHD1 limits human T cell leukemia virus type 1 infection of monocytes via STING-mediated apoptosis. *Cell Host Microbe* *14*, 422–434.
- Takeda, S., Maeda, M., Morikawa, S., Taniguchi, Y., Yasunaga, J.-I., Nosaka, K., Tanaka, Y., and Matsuoka, M. (2004). Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int. J. Cancer* *109*, 559–567.
- Takenouchi, N., Jones, K.S., Lisinski, I., Fugo, K., Yao, K., Cushman, S.W., Ruscetti, F.W., and Jacobson, S. (2007). GLUT1 is not the primary binding receptor but is associated with cell-to-cell transmission of human T-cell leukemia virus type 1. *J. Virol.* *81*, 1506–1510.
- Takezaki, T., Tajima, K., Ito, M., Ito, S., Kinoshita, K., Tachibana, K., and Matsushita, Y. (1997). Short-term breast-feeding may reduce the risk of vertical transmission of HTLV-I. The Tsushima ATL Study Group. *Leukemia* *11 Suppl 3*, 60–62.
- Tattermusch, S., Skinner, J.A., Chaussabel, D., Banchereau, J., Berry, M.P., McNab, F.W., O'Garra, A., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2012). Systems biology approaches reveal a specific interferon-inducible signature in HTLV-1 associated myelopathy. *PLoS Pathog.* *8*, e1002480.
- Terada, Y., Kamoi, K., Komizo, T., Miyata, K., and Mochizuki, M. (2017). Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 and Eye Diseases. *J. Ocul. Pharmacol. Ther. Off. J. Assoc. Ocul. Pharmacol. Ther.*
- de Thé, G., and Bomford, R. (1993). An HTLV-I vaccine: why, how, for whom? *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *9*, 381–386.
- de-Thé, G., Gessain, A., Gazzolo, L., Robert-Guroff, M., Najberg, G., Calender, A., Peti, M., Brubaker, G., Bensliman, A., and Fabry, F. (1985). Comparative seroepidemiology of HTLV-I and HTLV-III in the French West Indies and some African countries. *Cancer Res.* *45*, 4633s–4636s.
- Tosi, G., Forlani, G., Andresen, V., Turci, M., Bertazzoni, U., Franchini, G., Poli, G., and Accolla, R.S. (2011). Major histocompatibility complex class II transactivator CIITA is a viral restriction factor that targets human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax-1 function and inhibits viral replication. *J. Virol.* *85*, 10719–10729.
- Turville, S.G., Santos, J.J., Frank, I., Cameron, P.U., Wilkinson, J., Miranda-Saksena, M., Dable, J., Stössel, H., Romani, N., Piatak, M., et al. (2004). Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* *103*, 2170–2179.
- Uchiyama, T., Yodoi, J., Sagawa, K., Takatsuki, K., and Uchino, H. (1977). Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* *50*, 481–492.
- Umehara, F., Izumo, S., Ronquillo, A.T., Matsumuro, K., Sato, E., and Osame, M. (1994). Cytokine expression in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *53*, 72–77.

- Untergasser, A., Zedler, U., Langenkamp, A., Hösel, M., Quasdorff, M., Esser, K., Dienes, H.-P., Tappertzhofen, B., Kolanus, W., and Protzer, U. (2006). Dendritic cells take up viral antigens but do not support the early steps of hepatitis B virus infection. *Hepatology*, *43*, 539–547.
- Valeri, V.W., Hryniewicz, A., Andresen, V., Jones, K., Fenizia, C., Bialuk, I., Chung, H.K., Fukumoto, R., Parks, R.W., Ferrari, M.G., et al. (2010). Requirement of the human T-cell leukemia virus p12 and p30 products for infectivity of human dendritic cells and macaques but not rabbits. *Blood*, *116*, 3809–3817.
- Van Damme, N., Goff, D., Katsura, C., Jorgenson, R.L., Mitchell, R., Johnson, M.C., Stephens, E.B., and Guatelli, J. (2008). The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe*, *3*, 245–252.
- Van Prooyen, N., Gold, H., Andresen, V., Schwartz, O., Jones, K., Ruscetti, F., Lockett, S., Gudla, P., Venzon, D., and Franchini, G. (2010). Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *107*, 20738–20743.
- Varghese, F.S., Rausalu, K., Hakanen, M., Saul, S., Kümmerer, B.M., Susi, P., Merits, A., and Ahola, T. (2017). Obatocloxin Inhibits Alphavirus Membrane Fusion by Neutralizing the Acidic Environment of Endocytic Compartments. *Antimicrob. Agents Chemother.*, *61*.
- Vasquez, P., Sanchez, G., Volante, C., Vera, L., Ramirez, E., Soto, G., and Lee, H. (1991). Human T-lymphotropic virus type I: new risk for Chilean population. *Blood*, *78*, 850–851.
- Villari, G., Jayo, A., Zanet, J., Fitch, B., Serrels, B., Frame, M., Stramer, B.M., Goult, B.T., and Parsons, M. (2015). A direct interaction between fascin and microtubules contributes to adhesion dynamics and cell migration. *J. Cell Sci.*, *128*, 4601–4614.
- Vorobjeva, N., Prikhodko, A., Galkin, I., Pletjushkina, O., Zinovkin, R., Sud'ina, G., Chernyak, B., and Pinegin, B. (2017). Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils in vitro. *Eur. J. Cell Biol.*
- Wang, J.-H., Janas, A.M., Olson, W.J., and Wu, L. (2007). Functionally distinct transmission of human immunodeficiency virus type 1 mediated by immature and mature dendritic cells. *J. Virol.*, *81*, 8933–8943.
- Watanabe, T. (2011). Current status of HTLV-1 infection. *Int. J. Hematol.*, *94*, 430–434.
- Watchmaker, P.B., Lahl, K., Lee, M., Baumjohann, D., Morton, J., Kim, S.J., Zeng, R., Dent, A., Ansel, K.M., Diamond, B., et al. (2014). Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat. Immunol.*, *15*, 98–108.
- Wertheimer, A.M., Bakke, A., and Rosen, H.R. (2004). Direct enumeration and functional assessment of circulating dendritic cells in patients with liver disease. *Hepatology*, *40*, 335–345.
- Winter, H.Y., and Marriott, S.J. (2007). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax enhances serum response factor DNA binding and alters site selection. *J. Virol.*, *81*, 6089–6098.

de Witte, L., Nabatov, A., Pion, M., Fluitsma, D., de Jong, M.A.W.P., de Gruijl, T., Piguet, V., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B.H. (2007). Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat. Med.* *13*, 367–371.

Wu, L., and KewalRamani, V.N. (2006). Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 859–868.

Wu, W., Cheng, W., Chen, M., Xu, L., and Zhao, T. (2016). [HTLV-1 bZIP Factor (HBZ): Roles in HTLV-1 Oncogenesis]. *Bing Xue Bao Chin. J. Virol.* *32*, 235–242.

Xie, Q., Shen, H.-C., Jia, N.-N., Wang, H., Lin, L.-Y., An, B.-Y., Gui, H.-L., Guo, S.-M., Cai, W., Yu, H., et al. (2009). Patients with chronic hepatitis B infection display deficiency of plasmacytoid dendritic cells with reduced expression of TLR9. *Microbes Infect.* *11*, 515–523.

Yamaguchi, Y., Tsumura, H., Miwa, M., and Inaba, K. (1997). Contrasting effects of TGF-beta 1 and TNF-alpha on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem Cells Dayt. Ohio* *15*, 144–153.

Yamano, Y., and Coler-Reilly, A. (2017). HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4(+)CCR4(+) T cells that produces an inflammatory positive feedback loop via astrocytes in HAM/TSP. *J. Neuroimmunol.* *304*, 51–55.

Yamano, Y., Cohen, C.J., Takenouchi, N., Yao, K., Tomaru, U., Li, H.-C., Reiter, Y., and Jacobson, S. (2004). Increased expression of human T lymphocyte virus type I (HTLV-I) Tax11-19 peptide-human histocompatibility leukocyte antigen A\*201 complexes on CD4+ CD25+ T Cells detected by peptide-specific, major histocompatibility complex-restricted antibodies in patients with HTLV-I-associated neurologic disease. *J. Exp. Med.* *199*, 1367–1377.

Yamano, Y., Araya, N., Sato, T., Utsunomiya, A., Azakami, K., Hasegawa, D., Izumi, T., Fujita, H., Aratani, S., Yagishita, N., et al. (2009). Abnormally high levels of virus-infected IFN-gamma+ CCR4+ CD4+ CD25+ T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder. *PLoS One* *4*, e6517.

Yang, A.S., and Lattime, E.C. (2003). Tumor-induced interleukin 10 suppresses the ability of splenic dendritic cells to stimulate CD4 and CD8 T-cell responses. *Cancer Res.* *63*, 2150–2157.

Yang, L., Kotomura, N., Ho, Y.-K., Zhi, H., Bixler, S., Schell, M.J., and Giam, C.-Z. (2011). Complex cell cycle abnormalities caused by human T-lymphotropic virus type 1 Tax. *J. Virol.* *85*, 3001–3009.

Yaseen, I.H., Monk, P.N., and Partridge, L.J. (2017). Tspan2: a tetraspanin protein involved in oligodendrogenesis and cancer metastasis. *Biochem. Soc. Trans.* *45*, 465–475.

Yoon, C.-H., Kim, S.-Y., Byeon, S.E., Jeong, Y., Lee, J., Kim, K.P., Park, J., and Bae, Y.-S. (2015). p53-derived host restriction of HIV-1 replication by protein kinase R-mediated Tat phosphorylation and inactivation. *J. Virol.* *89*, 4262–4280.

Yoshida, M., Miyoshi, I., and Hinuma, Y. (1982). Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 2031–2035.

- Yoshie, O., Fujisawa, R., Nakayama, T., Harasawa, H., Tago, H., Izawa, D., Hieshima, K., Tatsumi, Y., Matsushima, K., Hasegawa, H., et al. (2002). Frequent expression of CCR4 in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1-transformed T cells. *Blood* 99, 1505–1511.
- Yoshio, S., Kanto, T., Kuroda, S., Matsubara, T., Higashitani, K., Kakita, N., Ishida, H., Hiramatsu, N., Nagano, H., Sugiyama, M., et al. (2013a). Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)(+) dendritic cells are a potent producer of interferon- $\lambda$  in response to hepatitis C virus. *Hepatology*. Baltimore, Md 57, 1705–1715.
- Yoshio, S., Kanto, T., Kuroda, S., Matsubara, T., Higashitani, K., Kakita, N., Ishida, H., Hiramatsu, N., Nagano, H., Sugiyama, M., et al. (2013b). Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)(+) dendritic cells are a potent producer of interferon- $\lambda$  in response to hepatitis C virus. *Hepatology*. Baltimore, Md 57, 1705–1715.
- Younis, I., and Green, P.L. (2005). The human T-cell leukemia virus Rex protein. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 10, 431–445.
- Yu, C.I., Becker, C., Metang, P., Marches, F., Wang, Y., Toshiyuki, H., Banchereau, J., Merad, M., and Palucka, A.K. (2014). Human CD141+ dendritic cells induce CD4+ T cells to produce type 2 cytokines. *J. Immunol.* Baltimore, Md 1950 193, 4335–4343.
- Yu, H.J., Reuter, M.A., and McDonald, D. (2008). HIV traffics through a specialized, surface-accessible intracellular compartment during trans-infection of T cells by mature dendritic cells. *PLoS Pathog.* 4, e1000134.
- Yuen, C.-K., Chan, C.-P., Fung, S.-Y., Wang, P.-H., Wong, W.-M., Tang, H.-M.V., Yuen, K.-S., Chan, C.-P., Jin, D.-Y., and Kok, K.-H. (2016). Suppression of Type I Interferon Production by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Oncoprotein Tax through Inhibition of IRF3 Phosphorylation. *J. Virol.* 90, 3902–3912.
- Yurkiv, V.A., Melikhov, V.I., and Shubin, V.S. (2016). Effect of Ionophores on Activity of Na(+),Cl(-)(HCO 3(-)))-ATPase. *Bull. Exp. Biol. Med.* 161, 763–766.
- Zhang, J., Yamada, O., Kawagishi, K., Araki, H., Yamaoka, S., Hattori, T., and Shimotohno, K. (2008). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax modulates interferon-alpha signal transduction through competitive usage of the coactivator CBP/p300. *Virology* 379, 306–313.
- Zhang, J.-G., Czabotar, P.E., Policheni, A.N., Caminschi, I., Wan, S.S., Kitsoulis, S., Tullett, K.M., Robin, A.Y., Brammananth, R., van Delft, M.F., et al. (2012). The dendritic cell receptor Clec9A binds damaged cells via exposed actin filaments. *Immunity* 36, 646–657.
- Zhao, T. (2016). The Role of HBZ in HTLV-1-Induced Oncogenesis. *Viruses* 8.
- Zhao, T., Satou, Y., Sugata, K., Miyazato, P., Green, P.L., Imamura, T., and Matsuoka, M. (2011). HTLV-1 bZIP factor enhances TGF- $\beta$  signaling through p300 coactivator. *Blood* 118, 1865–1876.
- Zhou, J., Shen, B., Zhang, W., Wang, J., Yang, J., Chen, L., Zhang, N., Zhu, K., Xu, J., Hu, B., et al. (2014). One-step generation of different immunodeficient mice with multiple gene modifications by CRISPR/Cas9 mediated genome engineering. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 46, 49–55.

Zhou, Q., Chen, Y., Zhang, L., Zhong, Y., Zhang, Z., Wang, R., Jin, M., Gong, M., Qiu, Y., and Kong, D. (2017). Antiproliferative effect of ZSTK474 alone or in combination with chemotherapeutic drugs on HL60 and HL60/ADR cells. *Oncotarget*.

Zou, L., Zhou, J., Zhang, J., Li, J., Liu, N., Chai, L., Li, N., Liu, T., Li, L., Xie, Z., et al. (2009). The GTPase Rab3b/3c-positive recycling vesicles are involved in cross-presentation in dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 15801–15806.

Zucker-Franklin, D., Fraig, M., and Grusky, G. (1995). Interaction of human immunodeficiency virus type 1, human T-cell leukemia/lymphoma virus type I (HTLV-I), and HTLV-II with in vitro-generated dendritic cells. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* *2*, 343–348.

## 6 Document annexe

Le document annexe intitulé “Quand le cytosquelette d’actine fait le jeu des rétrovirus” est une nouvelle soumise à la revue Médecine/Sciences en avril 2017.

Quand le cytosquelette d'actine fait le jeu des rétrovirus

The actin cytoskeleton goes retroviral

Elodie Teruel\*, Gerges Rizkallah\*, Chloé Journo<sup>¶</sup> et Hélène Dutartre<sup>¶</sup>

\* contribution égale en tant que premiers auteurs. <sup>¶</sup> contribution égale en tant qu’auteurs seniors.

Centre international de Recherche en Infectiologie, Equipe Oncogénèse Retrovirale, INSERM U1111 – Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon, 46 allée d'Italie, F-69007, Lyon, France

Equipe labellisée "Ligue Nationale Contre le Cancer"

Correspondance : helene.dutartre@ens-lyon.fr, chloe.journo@ens-lyon.fr

### **Le rétrovirus HTLV-1, un modèle de choix pour étudier le rôle du cytosquelette dans la transmission virale**

Les virus, parasites intracellulaires obligatoires, exploitent diverses stratégies pour se propager au sein d'un hôte infecté. Des particules virales peuvent être libérées dans le milieu extracellulaire, ou bien profiter des contacts cellulaires pour se propager directement de cellule à cellule en évitant le milieu extracellulaire. Les contacts cellulaires peuvent prendre la forme d'extensions cellulaires (filopodes, nanotubes) ou d'une zone de contact étendue, appelée "synapse virologique" (VS). La formation de la VS nécessite à la fois l'établissement d'une zone d'adhésion intercellulaire et l'adressage des éléments viraux vers cette zone de contact, deux processus qui reposent sur des remaniements du cytosquelette dans la cellule infectée. Le rétrovirus HTLV-1 (*Human T-Lymphotropic Virus type 1*) se transmet principalement par contact cellulaire, les particules virales libres n'étant que peu infectieuses. La protéine virale transactivatrice Tax induit l'expression de Gem, une protéine associée au cytosquelette d'actine, qui contribue à la migration cellulaire et à la formation de conjugués entre les cellules infectées et les cellules cibles (Chevalier et al., 2014)]. Tax induit également l'expression de la protéine d'adhésion ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule 1*) qui stabilise le contact cellulaire. L'engagement polarisé d'ICAM-1 à la surface de la cellule infectée permet par ailleurs le positionnement du centre organisateur des microtubules vers la VS, ce qui favoriserait la polarisation de la transmission virale (Nejmeddine et al., 2009)]. La fascine est une protéine qui contrôle la formation des faisceaux d'actine à partir de l'actine filamenteuse (Otani et al., 2016)].

Elle favorise ainsi la migration et l'adhésion cellulaires [4] et stabilise les protrusions cellulaires et des filopodes, ce qui facilite les contacts cellulaires [5-6]. Il a récemment été montré que l'expression de la fascine est également induite par Tax (Kress et al., 2011; Mohr et al., 2015)]. Ici, Gross et al. démontrent que la fascine est un nouvel acteur de la transmission virale [9].

### **Un outil pour quantifier le virus néo-transmis**

Afin d'évaluer le rôle de la fascine dans la transmission d'HTLV-1, les auteurs ont utilisé un système permettant de distinguer le virus avant et après transmission (figure 1A). Il s'agit d'une construction virale modifiée pour contenir un gène rapporteur dont l'activité n'est autorisée qu'après un événement de transmission [10]. La construction est encadrée par les séquences LTR (*Long Terminal Repeats*) d'HTLV-1. Au sein de cette construction, le gène rapporteur de la luciférase, placé sous contrôle d'un promoteur fort (CMV, *CytoMegalovirus*), est orienté en anti-sens par rapport à l'organisation de la construction. Le gène rapporteur est interrompu par un intron orienté en anti-sens par rapport au gène rapporteur mais en sens par rapport à l'organisation de la construction. Ainsi, dans les cellules productrices, le transcrit produit à partir du promoteur CMV ne sera pas épissé et la protéine luciférase ne sera donc pas traduite. En revanche, la transcription virale initiée par le LTR 5' permet l'épissage de l'intron, générant un ARN génomique viral correspondant à la construction sans intron. Pour que ce génome viral puisse être encapsidé, un vecteur d'encapsidation codant pour les protéines de capsid et d'enveloppe d'HTLV-1 ou permettant un pseudotypage par une enveloppe à tropisme large est co-transfecté. Ainsi, les particules virales contenant le génome viral sans intron peuvent se transmettre à de nouvelles cellules cibles dans lesquelles la transcription inverse et l'intégration du génome viral sans intron ont lieu. La transcription du gène rapporteur sous contrôle du promoteur CMV permet alors l'expression de la luciférase. Ainsi, l'activité luciférase reflète la quantité de virus néo-transmis.

### **La fascine facilite la transmission d'HTLV-1**

Dans ce système, les auteurs ont éteint l'expression de la fascine à l'aide d'ARN interférents. Après contrôle de l'expression des protéines par Western-Blot (fascine, transactivateur viral Tax, protéine de capsid virale p55<sup>gag</sup>), les auteurs ont analysé d'une part la transmission virale par suivi de l'activité luciférase, et d'autre part la production de particules virales libres par la quantification de p19<sup>gag</sup>, protéine de matrice d'HTLV-1, avec un test ELISA sur le surnageant de culture (figure 1B). L'extinction de l'expression de la fascine dans des cellules 293T (lignée cellulaire de laboratoire) réduit de façon significative la transmission virale. L'extinction de l'expression de la fascine réduit également la production de particules virales libres mais uniquement lorsque Tax est présente, suggérant que Tax et la fascine coopèrent au cours de ce processus.

Dans ce premier jeu d'expérience, la fascine est éteinte dans les cellules 293T qui sont à la fois cellules productrices et cellules cibles du virus. Pour exclure un possible rôle de la fascine dans les étapes précoces de l'infection dans les cellules cibles, les expériences suivantes ont été réalisées en éteignant l'expression de la fascine spécifiquement dans les cellules productrices. De plus, afin de se rapprocher de la physiologie d'une infection à HTLV-1, les auteurs ont utilisé comme cellules productrices des lymphocytes T (lignée Jurkat), cibles principales du virus *in vivo*. Les cellules Jurkat expriment peu la fascine, au contraire des 293T, et de fait le taux basal de transmission virale n'est pas affecté par l'extinction de la fascine dans les Jurkat productrices. En



revanche, lorsque les cellules Jurkat sont également transfectées par Tax, qui induit l'expression de la fascine, les résultats obtenus en 293T sont confirmés.

La contribution de la fascine à la transmission d'HTLV-1 a également été vérifiée dans des lignées cellulaires chroniquement infectées. Pour cela, le système rapporteur décrit plus haut n'est plus utilisé puisque les lignées infectées produisent naturellement du virus (figure 1C). La transmission virale est alors suivie par l'utilisation de cellules cibles comportant le gène de la luciférase sous contrôle du LTR d'HTLV-1, lui-même transactivé par la protéine Tax. Ainsi, après coculture avec les cellules infectées, si le virus est transmis à la cellule cible, la protéine Tax est produite et peut activer l'expression de la luciférase. Les résultats montrent que l'activité luciférase est diminuée d'environ 50% lorsque l'expression de la fascine est réprimée dans les cellules productrices, ce qui suggère une fois de plus son rôle dans la transmission virale. Le transfert du virus des cellules productrices vers les cellules cibles est également mesuré par la détection de la protéine de matrice p19<sup>gag</sup> dans les cellules cibles par cytométrie en flux. L'ensemble de ces résultats montre donc qu'indépendamment du système expérimental utilisé, la fascine joue un rôle crucial dans la transmission d'HTLV-1 de cellule à cellule.

### **La localisation de la fascine est cruciale pour faciliter la transmission d'HTLV-1**

Afin de déterminer si l'effet de la fascine sur la transmission virale dépend de ses fonctions régulatrices sur le cytosquelette d'actine, les auteurs ont cherché non plus à éteindre son expression, mais à annuler ses fonctions régulatrices en la délocalisant du cytosquelette d'actine. Pour cela, ils ont utilisé une technique élégante basée sur l'expression de nanobodies dans les cellules productrices de virus. Les nanobodies sont des versions réduites d'anticorps de camélidés, où seul le domaine de liaison à l'antigène est exprimé. Ici, les nanobodies dirigés contre la fascine sont couplés à des séquences d'adressage protéique vers la membrane externe de la mitochondrie. Après avoir contrôlé que les nanobodies ne modifient pas le niveau d'expression de la fascine mais qu'ils induisent bien sa délocalisation, les auteurs montrent que la délocalisation de la fascine diminue la production et la transmission virales. Ainsi, c'est spécifiquement la localisation subcellulaire de la fascine qui contrôle la transmission d'HTLV-1, probablement par l'intermédiaire du cytosquelette d'actine.

### **La fascine ne participe pas à la formation de conjugués mais pourrait contribuer à l'adressage du virus aux zones de contact cellule-cellule**

Pour identifier le mécanisme moléculaire par lequel la fascine augmente la transmission virale, les auteurs ont ensuite analysé son implication éventuelle dans la formation de conjugués entre cellules productrices et cellules cibles. De façon surprenante, l'absence de fascine ne modifie pas la formation de conjugués. En revanche, les auteurs ont observé que dans les cellules où la fascine est absente de la zone de contact cellulaire, la protéine p19<sup>gag</sup> n'y est pas localisée de façon efficace, ce qui suggère que la fascine contrôle l'adressage du virus au site de contact. Cependant, l'analyse de la distribution de p19<sup>gag</sup> par microscopie confocale n'a pas été réalisée sur des cellules productrices dans lesquelles l'expression de la fascine serait réprimée ou la protéine délocalisée. On ne peut donc pas formellement conclure que la localisation de la fascine au niveau du contact cellulaire influence l'adressage du virus.

## **CONCLUSION**

La fascine et Gem, deux protéines cellulaires contrôlant le remodelage du cytosquelette et dont l'expression est induite par Tax, agissent donc différemment sur la transmission virale : alors que

la fascine favorise la production virale sans modifier la formation de conjugués, Gem favorise la formation des conjugués sans modifier la production virale. Ceci suggère que la fascine pourrait contrôler l'adressage des particules virales vers la membrane plasmique (Figure 2). Les mécanismes moléculaires qui gouvernent l'effet de la fascine restent toutefois à préciser. De façon intéressante, le virus d'Epstein-Barr (EBV) induit également l'expression de la fascine via la protéine LMP1 (*Latent Membrane Protein 1*), mais le rôle de la fascine dans la transmission d'EBV n'a pas été analysé. En revanche, la fascine confère aux lymphocytes infectés par EBV des capacités invasives [11]. Aussi la fascine pourrait être impliquée dans l'invasivité des cellules infectées par HTLV-1, à l'origine de l'infiltration du système nerveux central chez les patients souffrant de myélopathie associée à HTLV-1 ou de l'infiltration du derme chez les patients souffrant de leucémie T de l'adulte à manifestation cutanée. Ainsi, la répression de la fascine pourrait conduire à une thérapeutique efficace en infectiologie, pour limiter la transmission virale, et en oncologie, pour abolir les propriétés invasives des cellules cancéreuses.

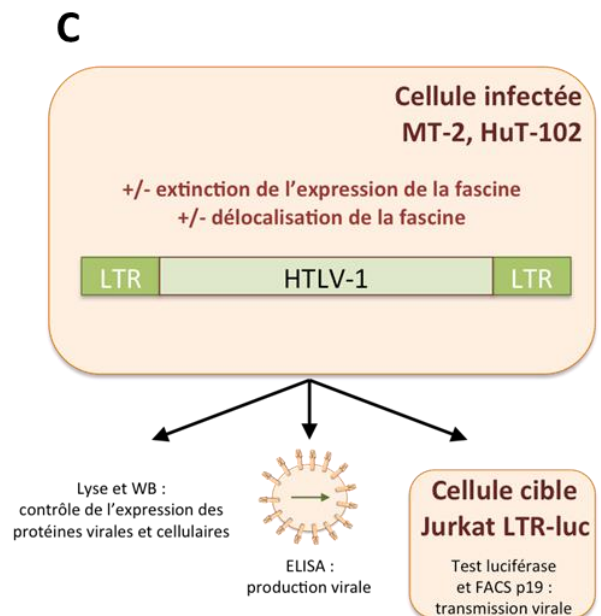
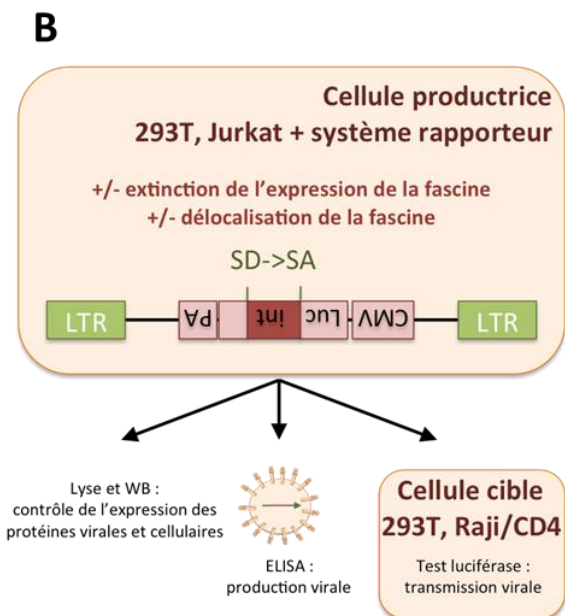
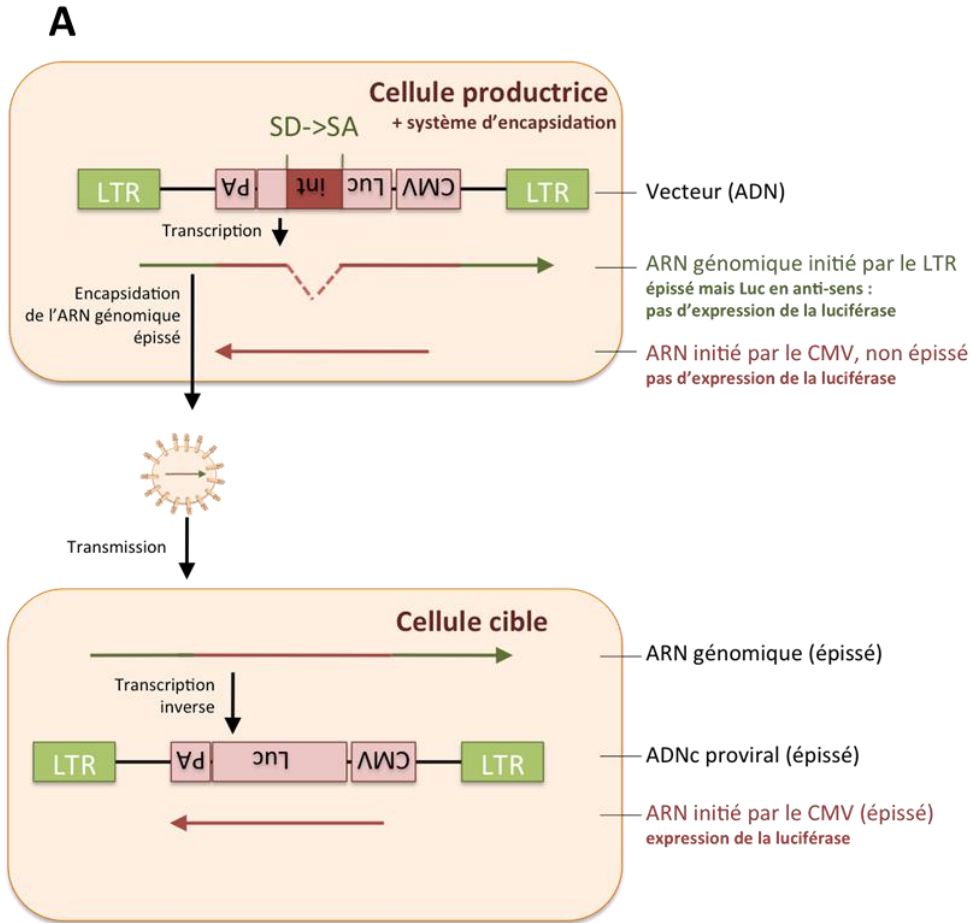
### **Légendes :**

#### **Figure 1. Représentation schématique des modèles expérimentaux utilisés dans l'étude.**

**(A)** Représentation schématique du système rapporteur permettant de quantifier la transmission virale. Dans la cellule productrice, le gène rapporteur de la luciférase (Luc) sous le contrôle d'un promoteur CMV (en rouge) est orienté en anti-sens et est flanqué des séquences LTR d'HTLV-1 (en vert). Ni l'ARN génomique épissé initié par le LTR (flèche verte), ni l'ARN non-épissé initié par le CMV (flèche rouge) ne permettent l'expression de la luciférase. Après transmission de l'ARN génomique épissé à la cellule cible, la transcription inverse permet la production d'un ADN complémentaire (ADNc) proviral épissé, à l'origine d'un ARN initié par le CMV (flèche rouge) et de l'expression de la luciférase.

**(B)** Représentation schématique des expériences réalisées avec le système rapporteur, après extinction ou délocalisation de la fascine.

**(C)** Représentation schématique des expériences réalisées dans les lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1, après extinction ou délocalisation de la fascine.



## Figure 2. Schéma récapitulatif des rôles de la fascine lors de la transmission d'HTLV-1.

Dans la cellule infectée, le génome proviral (représenté en vert) contrôle l'expression des protéines virales, dont la protéine Tax et les protéines nécessaires à la formation de nouvelles particules virales, regroupées dans le cadre vert. Les flèches vertes symbolisent l'adressage des protéines virales soit vers la synapse virale (VS) soit vers la membrane plasmique. Dans les deux cas, elles forment des particules virales qui sont alors soit transmises à une cellule cible à travers une VS, soit relarguées dans le milieu extracellulaire. La fascine, dont l'expression est induite par Tax (représentée par une flèche large verte) est impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine (représenté par une flèche large grise). Elle peut être localisée au niveau de la VS ou des protusions cellulaires. Le rôle de la réorganisation du cytosquelette d'actine induite par la fascine est représenté par des flèches noires : elle facilite (+) la formation de la synapse virale, le relargage des virions et la formation des connexions longue ou courte distance vers les cellules cibles, probablement via l'augmentation du transport des protéines virales.

