



**HAL**  
open science

# Étude moléculaire du TNF-Related Apoptosis Induced Ligand (TRAIL) et de l'activation du Toll-Like Receptor 7 (TLR7) dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes lors de la réponse antivirale

Nikaïa Smith

► **To cite this version:**

Nikaïa Smith. Étude moléculaire du TNF-Related Apoptosis Induced Ligand (TRAIL) et de l'activation du Toll-Like Receptor 7 (TLR7) dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes lors de la réponse antivirale. Sciences agricoles. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCB145 . tel-01674260

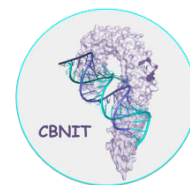
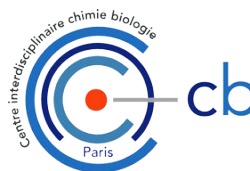
**HAL Id: tel-01674260**

**<https://theses.hal.science/tel-01674260>**

Submitted on 2 Jan 2018

**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.



# Thèse de Doctorat de l'Université Paris Descartes

École Doctorale ED 563 : Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries  
Spécialité : Pharmacologie

Présentée par

**Nikaïa SMITH**

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Paris Descartes

Sujet de Thèse

**Étude moléculaire du TNF-Related Apoptosis Induced Ligand (TRAIL)  
et de l'activation du Toll-Like Receptor 7 (TLR7) dans les cellules  
dendritiques plasmacytoïdes lors de la réponse antivirale**

Soutenue le 9 Novembre 2015 devant le jury composé de :

<b>Président</b>	Olivier Neyrolles	<i>Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Toulouse, France</i>
<b>Rapporteurs</b>	Françoise Bachelerie Anne-Sophie Beignon	<i>Université Paris Sud, Clamart, France</i> <i>Université Paris Sud, CEA, Fontenay aux-Roses, France</i>
<b>Examineurs</b>	Maria-Isabel Thoulouze Naomi Taylor	<i>Institut Pasteur, Paris, France</i> <i>Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM), Montpellier, France</i>
<b>Membre Invité</b>	Olivier Schwartz	<i>Institut Pasteur, Paris, France</i>
<b>Directeur de thèse</b>	Jean-Philippe Herbeuval	<i>Université Paris Descartes, Paris, France</i>



## REMERCIEMENTS

À MON DIRECTEUR DE THÈSE :

Je veux dire un énorme merci à mon directeur de thèse, Jean-Philippe Herbeuval. Quand on s'est rencontré lors de mon M2, j'étais en stage de chimie et pas très optimiste quant à mon avenir potentiel en thèse. Tu as su me montrer qu'il existait différentes recherches, me remotiver... Je me souviendrai toujours de ces nocturnes à Necker pour arriver à finaliser les expériences pour mon M2, comment tu as subtilement essayé de me faire louper mes entretiens pour les écoles de commerce et surtout le travail acharné que tu as fourni pour que mon rapport soit parfait et encore plus la préparation méticuleuse pour l'oral de l'école doctorale ! Puis mes trois années de thèse... Elles ont été mouvementées mais inoubliables ! Du déménagement, à la mise du place du laboratoire, les commandes (...) Mais ce que je retiendrai le plus, ce sont nos discussions scientifiques, l'élaboration des plans de manip, l'analyse des data... Merci de m'avoir supportée pendant ces presque 4 années, de me voir débarquer dans ton bureau à la moindre idée et de t'imposer mes choix de manip. Merci de m'avoir enseigné tout ce que je sais aujourd'hui, autant d'un point de vue des techniques que sur les connaissances scientifiques. Un énorme merci aussi pour ton soutien infini dans tous les moments, ta bonne humeur et ton enthousiasme ! Vraiment un énorme merci pour tout...

AUX MEMBRES DE MON JURY :

Je tenais à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci à Anne-Sophie Beignon pour ces remarques pertinentes sur mon manuscrit et de m'avoir orientée vers des questions intéressantes pour améliorer mon écrit ainsi que de m'avoir proposée de le restructurer de façon plus cohérente. Merci à Françoise Bachelerie d'avoir accepté à la dernière minute de bien vouloir évaluer mon travail et d'avoir mis en évidence mes lacunes ; même si cela aura été beaucoup de travail, j'ai appris énormément ces dernières semaines sur CXCR4 grâce à vous. Merci à mes deux examinatrices, Naomi Taylor et Maria-Isabel Thoulouze d'avoir accepté de faire partie de cette thèse. Un grand merci à Olivier Neyrolles d'avoir accepter de présider mon jury de thèse et pour ses conseils de silencing. Je tenais aussi à particulièrement remercier Olivier Schwartz d'avoir toujours été présent pour moi. Olivier, tu es une des premières personnes que j'ai rencontrées au tout début de ma thèse lors des UJC à Carry-le-Rouet et j'ai toujours pu compter sur toi et ce jusqu'à ma soutenance car tu me fais l'honneur de faire partie de mon jury, merci encore !



À MON LABORATOIRE D'ACCUEIL, L'UMR8601 :

Je tiens aussi à remercier les différents membres de l'UMR8601, qui m'a accueillie durant ses 5 années, notamment Francine Acher, en tant que directrice de l'unité, Christiane Garbay qui m'a recrutée en M2. Je veux particulièrement remercier Isabelle Artaud de m'avoir accueillie dans son laboratoire et merci pour nos discussions et notre collaboration même s'il elle aura été (trop) brève. Un grand merci à Pierre-Olivier Vidalain, qui a permis de remettre de la vie dans le laboratoire de bio et dans le P2 ainsi que pour toutes nos discussions et tes idées brillantes ! Je tiens aussi à remercier Kahina, Marie-Agnès, Maryse, Rodolphe, Anas... Mais aussi mes collègues de bureau Pascal Dao, Krystel El Hage et Florian Blanc avec qui nous avons eu de très bons moments de détente très bien mérités ! Merci aussi à Nicolas Pientrancosta et toutes ces connaissances !

À LA FACULTÉ BIOMÉDICALE:

Je voulais particulièrement remercier l'équipe de Sébastien Nisole. Seb, merci pour tout ! Merci pour tous tes conseils, tes idées, ta bonne humeur, tes blagues (notamment quand tu penses que tu es le roi de la purif... ;-)) ! Merci pour tous ces bons moments qui ont permis d'adoucir parfois les coup de mou ! Merci aussi à Jacques, qui m'a longtemps soutenue, avec qui on a traversé des hauts et des bas, notamment avec le P3 (et ses poubelles !), et qui m'a beaucoup apporté scientifiquement.

Je souhaite aussi remercier Jean-Maurice Petit et Stéphanie Dupuy, deux excellents ingénieurs de la plateforme de microscopie et cytométrie respectivement. Jean-Maurice, merci d'avoir toujours réussi à répondre à mes questions farfelues avec mes cellules microscopiques ! Steph merci d'avoir enfin mis en route la plateforme, et merci pour tous tes conseils.

Un grand merci à Charbel Massaad, directeur de l'UFR Biomédicale, qui a toujours été disponible, amical, présent et soucieux de mon bien être.

Merci aussi à l'équipe de Pierre Nioche qui m'a accueillie pour les expériences de cristallographie. Un grand merci à Jessica qui m'a encadrée pendant tous ces mois de mise en place des manip et avec qui j'ai passé, avec Grég, Roland, Muhammad et Camille tous ces moments de détente et de bonne humeur ! Un petit clin d'œil à Roland pour la relecture de mon pavé...

AUX MEMBRES DE L'INSTITUT PASTEUR:

Je souhaite remercier un certain nombre d'équipes de l'Institut Pasteur. Tout d'abord Marie-Lise Gougeon qui a passé beaucoup de temps à améliorer mon oral de concours de l'ED et qui a toujours été un soutien. Je souhaite aussi remercier l'équipe de Daniel Scott-Algara qui m'a permis d'utiliser leur FACS pendant plus de deux ans avant que celui des Saints-Pères ne soit en place. Merci énormément Daniel, je ne sais pas comment j'aurais pu faire ma thèse sans cet accès

au FACS et merci pour tous tes conseils technologiques et scientifiques. Un grand merci à Céline qui a toujours été présente pour moi, m'a soutenue, m'a aidée et m'a considérée comme faisant partie de son équipe. Merci aussi à Uriel, mon petit mexicain de la part de l'Hawaiienne ! Simon, je me souviendrais toujours de Hong Kong et de nos soirées ! Enfin, un grand merci aux membres de l'équipe d'Olivier Schwartz pour m'avoir toujours accueillie et aidée lors de mes séjours dans leur laboratoire.

#### AUX MEMBRES DE L'INSTITUT IMAGINE :

Un grand merci à Isabelle André-Schmutz et Chantal Lagresle de l'Institut Imagine pour tout... la collaboration, les discussions scientifiques et j'espère encore de longs échanges.

#### À L'EFS :

Les infirmières de l'EFS Cabanel, et plus particulièrement Marie-Line et Madeleine, qui ont toujours su me rendre service, me faire passer en priorité et me couvrir quand je n'envoyais pas le fax suffisamment en avance. Un grand merci à elles deux, sans qui un grand nombre de manip n'auraient pas pu avoir lieu !

#### À MES COPINES :

Lise et Morgane, les filles sans vous ma dernière année de thèse n'aurait pas été aussi agréable ! On sera reliées à vie à cause de la souffrance engendrée par des expériences tentées sur les Gen2.2 !!! Lise, merci de t'être occupée de moi tous ces moments à Pasteur. Je me souviendrai de toutes nos galères et de toutes nos nocturnes mais aussi tous les bons moments que cela a engendré. Morgane, j'ai adoré travailler avec toi, toutes ces soirées aux Saints-Pères à essayer de silencer IRF5, il nous aura donné du mal ! Merci les filles pour tous ces moments partagés avec vous au boulot comme à l'extérieur !

Ma Ghizlane, merci pour ta patience avec les WB, mes râleries et ma mauvaise humeur ! Merci mille fois pour ta bonne humeur constante, tu es capable de me remettre le sourire tout le temps. Méchamment Seb dirait que ton malheur me fait réaliser que ma vie est cool ! ;- ) Merci à vous deux d'avoir supporter mon stress à Bamberg et pour tous les bons moments !

#### À MA FAMILLE :

Merci à tous les membres de ma famille de m'avoir soutenue pendant ces trois années. Merci tout particulièrement à ma Maman de m'avoir encouragé à persévérer, d'avoir été une oreille supportive lors de mes moments de blues et d'avoir supporté mes humeurs ! Nane et Papou, de m'avoir dorlotée à chacune de mes visites. Thomas merci aussi d'avoir écouté toutes

mes histoires ! Papa, thank you for giving me your organisation skills... ;-)  
Lulu, Grandpa, thank you very much for the support, without it, my life wouldn't have been the same.

À TOUTES LES PERSONNES QUE J'AI PU OUBLIER ET À TOUS MES FUTURS LECTEURS...

*« La connaissance s'acquiert par l'expérience, tout le reste n'est que de l'information »*

*ALBERT EINSTEIN*



# TABLES DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	13
LISTE DES FIGURES.....	17
PRÉFACE.....	19
INTRODUCTION.....	21
I. LES RÉPONSES DE L'IMMUNITÉ INNÉE.....	23
I. A. RÉPONSES ANTIVIRALES DES CELLULES DENDRITIQUES PLASMACYTOÏDES (PDC) APRÈS RECONNAISSANCE DES PATHOGÈNES.....	23
I. A. 1. La voie endosomale de la famille des Toll-Like Receptors (TLR).....	23
I. A. 1. i. Généralités sur les TLR.....	23
I. A. 1. ii. Structure des TLR.....	24
I. A. 1. iii. Le trafficking des endosomes après stimulation.....	25
I. A. 1. iv. Le trafficking des TLR endosomaux des pDC, TLR7 et TLR9.....	26
I. A. 1. v. Le TLR7.....	28
I. A. 1. v. a. Ligands naturels.....	28
I. A. 1. v. b. Ligands synthétiques.....	28
I. A. 1. v. c. Discrimination entre l'ARN du non soi et du soi.....	29
I. A. 1. vi. Le TLR9.....	30
I. A. 1. vi. a. Ligands naturels et synthétiques.....	30
I. A. 1. vi. b. Discrimination entre l'ADN du non soi et du soi.....	31
I. A. 1. vii. Voies de signalisations intra-cytoplasmiques dépendantes des TLR.....	31
I. A. 1. vii. a. Voie dépendante de MyD88 menant à l'activation du NF- $\kappa$ B.....	32
I. A. 1. vii. b. Voie dépendante de MyD88 menant à l'activation des IRF.....	33
I. A. 1. vii. c. Les IRF : facteurs de transcription impliqués dans l'activation des gènes de l'IFN-I.....	34
I. A. 2. Les voies cytoplasmiques.....	38
I. A. 2. i. La voie de la famille des rétinolique acid-inducible gene I (RIG-I)-Like Receptors (RLR).....	38
I. A. 2. ii. La voie de la famille des NOD-Like Receptors (NLR).....	40
I. A. 2. iii. La voie de la famille des AIM-2-Like Receptors (ALR).....	41
I. A. 2. iv. La voie du Stimulator of Interferon Genes (STING).....	41
I. A. 3. La voie du récepteur RAGE.....	42
I. B. LES INTERFÉRONS DE TYPE I.....	44
I. B. 1. La famille des interférons des type I.....	44
I. B. 1. i. La découverte des interférons.....	44
I. B. 1. ii. Les différents types d'interférons de type I.....	44
I. B. 1. ii. a. L'interféron $\alpha$ .....	44
I. B. 1. ii. b. L'interféron $\beta$ .....	46
I. B. 1. ii. c. Les autres sous-types d'interférons de type I.....	46
I. B. 2. Production et mode d'action des interférons de type I.....	46
I. B. 2. i. Généralités sur le mode d'action des IFN-I.....	46
I. B. 2. ii. Voie de signalisation de l'IFN-I.....	47
I. B. 2. iii. Régulation basale de la voie de signalisation de l'IFN-I.....	49
I. B. 2. iv. Augmentation de la voie de signalisation de l'IFN-I.....	49
I. B. 2. v. Régulation quantitative de l'IFN-I.....	50
I. B. 2. vi. Signaux d'induction de la production d'IFN de type I.....	50
I. B. 2. vi. a. L'interaction de STAT avec d'autres facteurs de transcription.....	51
I. B. 2. vi. b. Régulation traductionnelle des réponses de l'IFN-I.....	51
I. B. 2. vii. Mécanisme de régulation de la voie de signalisation d'IFN.....	51
I. B. 3. Le rôle des Interferon Stimulated Gene (ISG).....	52
I. B. 4. Les « ISG cellulaires ».....	54

I. B. 4. i.	Les cellules qui expriment le ligand pro-apoptotique TNF-Related Apoptosis Induced Ligand (TRAIL).....	54
I. B. 4. ii.	Induction de l'expression de TRAIL.....	55
I. B. 4. iii.	Induction de TRAIL par et sur les pDC : TRAIL un ISG ?.....	57
I. B. 5.	Les autres familles d'interférons.....	58
I. B. 5. i.	Les interférons de type II.....	58
I. B. 5. ii.	Les interférons de type III.....	59
II. LES CELLULES DENDRITIQUES PLASMACYTOÏDES ET LEUR RÔLE DANS L'IMMUNITÉ.....		60
II. A. INTRODUCTION SUR LES CELLULES DENDRITIQUES PLASMACYTOÏDES HUMAINES.....		60
II. A. 1.	Découverte des pDC.....	60
II. A. 2.	Caractérisation de la morphologie des pDC humaines.....	61
II. A. 3.	Phénotypage des pDC humaines.....	61
II. A. 4.	Marqueurs caractéristiques des pDC.....	62
II. A. 5.	Ontogénie et origine des pDC.....	63
II. A. 6.	Localisation, migration et temps de vie des pDC.....	64
II. A. 7.	Modèles de lignées cellulaires des pDC.....	65
II. B. CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE DES PDC DANS L'IMMUNITÉ.....		67
II. B. 1.	Rôle des pDC dans l'immunité innée après reconnaissance des pathogènes.....	67
II. B. 2.	Capture et présentation de l'antigène.....	67
II. B. 3.	Interactions avec les autres cellules de l'immunité.....	68
II. B. 4.	Les fonctions cytotoxiques des pDC.....	69
II. B. 5.	Le rôle immunorégulateur des pDC.....	70
II. C. RÉGULATION NÉGATIVE DE LA RÉPONSE DES PDC.....		70
II. C. 1.	Rôle de ITAM et ITIM dans l'activation des pDC.....	70
II. C. 2.	Récepteur de surface possédant un ITAM.....	71
II. C. 3.	Récepteur de surface possédant un ITIM.....	72
III. IMPLICATION DES PDC, DE L'INTERFERON ET DE TRAIL EN PHYSIOPATHOLOGIE : UN RÔLE À DOUBLE TRANCHANT.....		74
III. A. GÉNÉRALITÉS.....		74
III. B. LES INFECTIONS VIRALES.....		76
III. B. 1.	Le rôle protecteur de l'IFN dans les infections virales.....	76
III. B. 2.	Le rôle nocif de l'IFN dans les infections virales.....	77
III. B. 3.	Le rôle complexe de la réponse innée dans l'infection par le VIH.....	79
III. C. LES INFECTIONS BACTÉRIENNES.....		82
III. C. 1.	L'IFN-I et les pDC dans les infections bactériennes.....	82
III. C. 2.	TRAIL dans les infections bactériennes.....	84
III. D. LES ALLERGIES.....		84
III. D. 1.	Sensibilisation due aux allergies.....	84
III. D. 2.	Antagonisme entre les réponses allergiques et antivirales.....	85
III. E. LES TUMEURS.....		86
III. E. 1.	Les pDC et l'IFN dans l'immuno-surveillance tumorale.....	86
III. E. 2.	L'IFN-I et les thérapies anticancéreuses.....	89
III. E. 3.	Controverse autour de l'utilisation de l'IFN-I en thérapie.....	90
III. E. 4.	TRAIL en cancérologie.....	90

III. F. LES MALADIES AUTO-IMMUNES.....	92
III. F. 1. Reconnaissance de l'ADN du soi par les pDC.....	92
III. F. 2. Reconnaissance de l'ARN du soi par les pDC.....	93
III. F. 3. Les pDC et l'IFN dans les maladies auto-immunes.....	93
III. F. 3. i. Généralités sur le rôle des pDC et de l'IFN-I dans les maladies auto-immunes...	94
III. F. 3. ii. Les effets néfastes des pDC et l'IFN-I dans le SLE.....	95
III. F. 3. iii. Rôle immunosuppresseur de l'IFN-I.....	96
III. F. 4. TRAIL dans les maladies auto-immunes.....	96
III. G. LES THÉRAPIES ANTI-INTERFÉRON.....	97
HYPOTHÈSES DE TRAVAIL.....	101
RÉSULTATS.....	105
ARTICLE N° 1.....	107
INTRODUCTION : LE RÔLE DES AMINES EN PHYSIOLOGIE.....	109
I. GÉNÉRALITÉS SUR LES MONOAMINES.....	109
II. GÉNÉRALITÉS SUR LES POLYAMINES.....	112
ARTICLE N°2.....	157
ARTICLE N°3.....	167
ARTICLE N°4.....	173
DISCUSSION, PRÉSENTATION DES RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES ET PERSPECTIVES.....	179
I. RÉSULTATS MAJEURS OBTENUS.....	181
II. MODÈLE UTILISÉ.....	181
III. QUEL LIEN EXISTE ENTRE L'ACTIVATION DE CXCR4 PAR DES AMINES ET L'ACTIVATION DES TLR ?.....	182
III. A. LE RÔLE DES AMINES SUR LES PDC.....	182
III. B. RÔLE DE CXCR4 DANS L'IMMUNITÉ.....	183
III. B. 1. Généralités sur le rôle de CXCR4 dans la physiologie.....	183
III. B. 2. Interaction entre CXCR4 et CXCL12.....	186
III. B. 3. Identification d'antagonistes de CXCR4.....	188
III. B. 4. CXCR4 n'est pas nécessaire à l'activation des pDC par le VIH.....	192
III. C. L'IMPORTANCE DE NOTRE DÉCOUVERTE EN PHYSIOLOGIE ET EN PHYSIOPATHOLOGIE.....	193
III. D. RÔLE THÉRAPEUTIQUE POTENTIEL.....	196
IV. QUESTIONS NON RÉSOUES.....	200
IV. A. LES AMINES ONT ELLES UN RÔLE UNIQUEMENT PROTECTEUR ?.....	200
IV. B. PEUT-ON CONSIDÉRER LES AMINES COMME DES LIGANDS BIAISÉS DE CXCR4 ?.....	200
IV. B. 1. Mécanisme d'activation des protéines G hétérotrimériques et des $\beta$ -arrestines par la fixation d'un ligand sur une protéine GPCR.....	200
IV. B. 1. i. Activation des protéines G.....	200
IV. B. 1. ii. Activation de la voie de la $\beta$ -arrestine.....	204
IV. B. 2. Les voies de signalisation induites par les amines dans les pDC.....	206
IV. C. QUEL EST LE RÔLE DES AMINES SUR L'ACIDIFICATION DES ENDOSOMES ?.....	209
IV. D. QUEL EST LE MÉCANISME POTENTIEL PAR LEQUEL L'ACTIVATION DE CXCR4 BLOQUE L'ACTIVATION DES PDC ?.....	210
V. CHALLENGE TECHNOLOGIQUE : LE SIRNA DANS DES PDC PRIMAIRES.....	214
V. A. GÉNÉRALITÉS SUR LE SIRNA.....	214



V. B. RÉSULTATS OBTENUS.....	215
V. C. RECHERCHE POTENTIELLE EN THÉRAPEUTIQUE.....	219
VI. LES CELLULES GÉANTES MULTINUCLÉES SONT-ELLES INFECTÉES ?.....	220
VII. QUESTIONS OUVERTES.....	222
VII. A. QUEL RÔLE POUR LA SPERMINE DANS LE SPERME ?.....	222
VII. B. POURQUOI LA PRÉSENCE ET LE RÔLE DES PDC DANS L'ORGANISME EST-IL REMIS EN QUESTION ?.....	223
VII. C. L'ÉVOLUTION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	224
ANNEXES.....	227
INTRODUCTION : TRAIL/APO2L, UN LIGAND PRO-APOPTOTIQUE.....	229
I. L'APOPTOSE : LA MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE.....	229
II. LES CASPASES : LES ACTRICES PRINCIPALES DE L'APOPTOSE.....	230
III. LES VOIES DE SIGNALISATION DE L'APOPTOSE.....	231
III. A. LA VOIE INTRINSÈQUE DE L'APOPTOSE.....	232
III. B. LA VOIE EXTRINSÈQUE DE L'APOPTOSE.....	232
III. B. 1. Vue d'ensemble de la voie extrinsèque.....	232
III. B. 2. Les facteurs de mort et leurs récepteurs : la superfamille du TNF.....	232
III. B. 3. Régulation de la voie extrinsèque de l'apoptose : c-FLIP.....	234
IV. TRAIL : UN LIGAND INDUCTEUR DE MORT.....	236
IV. A. POLYMORPHISME ET STRUCTURE DU GÈNE CODANT POUR TRAIL.....	236
IV. B. LES RÉCEPTEURS DE TRAIL.....	237
IV. B. 1. Les récepteurs de mort .....	238
IV. B. 1. i. Death Receptors 4 et 5.....	239
IV. B. 1. ii. Interaction et structure de TRAIL avec les récepteurs de mort.....	239
IV. B. 1. iii. Signalisation: cascade extrinsèque de l'apoptose .....	240
IV. B. 2. Les récepteurs leurres: Decoy Receptors 1 et 2 et l'ostéoprotégérine.....	241
IV. B. 2. i. Interaction de TRAIL avec les récepteurs leurres.....	241
IV. B. 2. ii. Signalisation: protection cellulaire.....	241
ARTICLE N°5, 6 ET 7.....	243
ARTICLE N°8, 9, 10, 11 ET 12.....	253
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	265
RÉSUMÉ / ABSTRACT.....	298

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>5-HT:</b> Sérotonine	<b>DC:</b> Dendritic cells
<b>7TM:</b> 7 Domaines Transmembranaires	<b>DCIR:</b> Dendritic cells immunoreceptor
<b>AIM2:</b> Absent In Melanoma 2	<b>DcR:</b> Decoy Receptor
<b>AKT:</b> Protein Kinase B	<b>DD:</b> Death Domain
<b>ALR:</b> AIM-2 Like Receptors	<b>DED:</b> Death effector domain
<b>AP:</b> Adaptator Protein	<b>DEDD:</b> Death effector domain containing DNA binding
<b>APC:</b> Antigen Presenting Cells	<b>DISC:</b> Death-inducing signaling complex
<b>APOBEC:</b> Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme Catalytic polypeptide	<b>dNTP:</b> Deoxynucleosides triphosphates
<b>ARF6:</b> ADP-Ribosylation Factor 6	<b>DR:</b> Death Receptor
<b>ARNm:</b> ARN messenger	<b>EEA1:</b> Early endosome antigen 1
<b>ARNt:</b> ARN de transfert	<b>EGFR:</b> Epidermal growth factor receptor
<b>AT-2:</b> Aldrithiol-2	<b>ERK:</b> Extracellular signal-regulated kinases
<b>ATG5:</b> Autophagy-related Gene 5	<b>FACS:</b> Fluorescence-activated cell sorting
<b>BAK:</b> Bcl-2 Antagonist Killer	<b>FADD:</b> FAS-Associated Death Domain protein
<b>BAX:</b> Bcl-2-Associated X Protein	<b>FAK:</b> Focal Adhesion Kinase
<b>Bcl-2:</b> B-cell lymphoma 2	<b>FGFR2:</b> Fibroblast Growth Factor Receptor 2
<b>Bcl2A1:</b> Anti-apoptotique Bcl2-related protein A1	<b>Flt-3L:</b> Fms-related tyrosine kinase 3 ligand
<b>BCR:</b> B-Cell Receptor	<b>FOXO3:</b> Factor forkhead box protein O3
<b>BDCA:</b> Blood DC Antigen	<b>GAS:</b> $\gamma$ -interferon Activated Site gene 88
<b>BLNK:</b> B-cell Linker	<b>GFP:</b> Green Fluorescent Protein
<b>BST2:</b> Bone marrow STromal cell antigen 2	<b>GM-CSF:</b> Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
<b>BTK:</b> Bruton's Tyrosine Kinase	<b>GPCR:</b> G Protein-Coupled Receptors
<b>CARD:</b> Caspase-Recruitment Domain	<b>GrB:</b> Granzyme B
<b>CARDIF:</b> CARD Adaptor Inducing IFN $\beta$	<b>GRK:</b> G protein-coupled Receptor Kinases
<b>CB:</b> Clobenpropit	<b>GSK3<math>\beta</math>:</b> Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$
<b>CBP:</b> (Cyclic-AMP-responsive-element-binding protein (CREB)-binding protein	<b>HA:</b> Histamine
<b>CCR:</b> C-C chemokine Receptor	<b>HCV:</b> Hepatitis C Virus
<b>CD:</b> Cluster of Differentiation	<b>HEV:</b> High Endothelial Venules
<b>cDC:</b> Conventional DC	<b>HHV-8:</b> Human HerpesVirus-8
<b>c-FLIP:</b> Cellular FADD-Like Interleukin-1 b-converting enzyme-like protease (FLICE)-Inhibitory Proteins	<b>HMGB1:</b> High-Mobility Group Box 1
<b>cGAS:</b> cGAMP-Synthetase	<b>HPV:</b> Human Papilloma Virus
<b>cIAP1/2:</b> Inhibitor of Apoptosis Protein-1 and -2	<b>HR:</b> Histamine Receptor
<b>CKR:</b> Chemokine Receptor	<b>HSC:</b> Hematopoietic Stem Cells
<b>CLP:</b> Common Lymphoid Progenitor	<b>Hsp90:</b> Heat Shock Protein
<b>CMH:</b> Complexe Majeur d'Histocompatibilité	<b>HSV:</b> Herpes Simplex Virus
<b>CMP:</b> Common Myeloid Progenitor	<b>HTLV-1:</b> Human T-Lymphotropic Virus 1
<b>CR2:</b> Complementary Receptor type 2	<b>IAD:</b> IRF Association Domain
<b>CRD:</b> Cystein-Rich extracellular Domain	<b>IAP:</b> Inhibitor of Apoptosis
<b>CRS:</b> Chemokine Recognition Site	<b>ICOS-L:</b> Inductible COStimulator Ligand
<b>CXCL:</b> C-X-C Ligand	<b>IDO:</b> Indoleamine-2,3-dioxygenase
<b>CXCR:</b> C-X-C chemokine receptor	<b>IFI16:</b> IFN $\gamma$ -Inducible protein 16
<b>DA:</b> Dopamine	<b>IFIT:</b> IFN-induced proteins with
<b>DAMP:</b> Danger Associated Molecular Pattern	<b>IFITM:</b> Interferon-induced transmembrane protein
<b>DAPI2:</b> DNAX activation protein 12	<b>IFITM:</b> Interferon-Induced Transmembrane proteins
<b>DBD:</b> DNA binding domain	<b>IFN:</b> Interferon

**IFNAR:** IFN Receptor  
**IKDC:** IFN $\gamma$ -producing Killer Dendritic Cells  
**IKK:** I $\kappa$ K kinase  
**IKpDC:** IFN-producing Killer plasmacytoid Dendritic Cells  
**IL:** InterLeukine  
**ILR:** Ig-like Receptor  
**ILT-7:** Immunoglobulin-Like Transcripts 7  
**IMS:** Mitochondrial Intermembrane Space  
**iNOS:** Inducible Nitric Oxide Synthase  
**IPC:** Interferon Producing Cells  
**IPS-1:** IFN $\beta$ -Promoter Stimulator 1  
**IRAK:** IL-1R-Associates Kinase  
**IRF:** Interferon Regulatory Factors  
**IRFE:** Interferon Regulatory Factors Element  
**ISC:** Interferon Signaling Compartment  
**ISG:** Interferon Stimulated Gene  
**ISGF3:** IFN-Stimulated Gene Factor 3  
**ISRE:** IFN-Stimulated Response Element  
**ITAM:** Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation  
**ITIM:** Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition  
**JAK:** Janus Kinase  
**JEV:** Japanese Encephalitis Virus  
**KO:** Knock Out  
**KSHV:** Kaposie's Sarcoma-associated HerpesVirus  
**LAMP:** Lysosomal-Associated Membrane Protein  
**LCMV:** Lymphocytic ChorioMeningitis Virus  
**LGP2:** Laboratory of Genetics and Physiology 2  
**LILRA4:** Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor subfamily A member 4  
**LNA:** Locked Nucleic Acid  
**LPS:** Lipopolysaccharide  
**LRO:** Lysosome-Related Organelle  
**LRR:** Leucine-Rich Region  
**MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase  
**MCMV:** Murine CytoMegalovirus  
**MDA5:** Melanoma-Differentiation-Associated  
**mDC:** Myeloid DC  
**MGC:** Multinuclear Giant Cells  
**MoDC:** Monocyte derived DC  
**MOMP:** Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization  
**mTOR:** Mammalian Target Of Rapamycin  
**MxA:** Myxovirus Resistance A  
**MyD88:** Myeloid Differentiation primary response  
**NAB2:** NGFI-A-Binding protein 2  
**NDV:** Newcastle Disease Virus  
**NELF:** Negative Elongation Factor  
**NES:** Nuclear Export Sequence  
**NF- $\kappa$ B:** Nuclear Factor-kappa B  
**NK:** Natural Killer  
**NLR:** NOD-Like Receptors  
**NLS:** Nuclear Localization Sequences  
**NOD:** Nucleotide-binding Oligomerization Domain  
**NP-1:** Neuropilin-1  
**OAS:** 2'-5'-oligoadenylate Synthetase  
**ODN:** Oligodeoxynucleotides  
**OPG:** Osteoprotegerin  
**OPN:** Osteopontin  
**PA:** Polyamines  
**PACSIN-1:** Protein kinase C and Casein kinase Substrate In Neurons 1  
**PAMP:** Pathogen-Associated Molecular Patterns  
**PAP:** Phosphatase Acide Prostatique  
**PBMC:** Peripheric Blood Mononuclear Cells  
**PCD:** Programmed Cell Death  
**pDC:** Plasmacytoid Dendritic Cells  
**PDL1:** Programmed Death-Ligand 1  
**PEG:** Polyethylene Glycol  
**PHA:** PhytoHemAgglutinin  
**PI3K:** Phospholinositide 3-Kinase  
**PIAS1:** Protein Inhibitor of Activated STAT1  
**PKC:** Protein Kinase C  
**PKR:** Protein Kinase RNA-activated  
**PLAD:** Pré-Ligand-Associated Domain  
**PMA:** Phorbol 12-Myristate 13-Acetate  
**PNA<sub>d</sub>:** Peripheral Node Addressin  
**PO:** Phosphodiesterases  
**Pol II:** RNA polymerase II  
**PRR:** Pattern Recognition Receptors  
**PS:** Phosphorothioates  
**PYHIN:** Pysin and HIN domain-containing protein family  
**PYK:** Pyruvate Kinase  
**QSAR:** Quantitative Structure-Activity Relationship  
**RAGE:** Receptor for Advanced Glycation End-product  
**RE:** Réticulum Endoplasmique  
**RIG-I:** Retinoic acid-Inducible Gene 1  
**RIP1:** Receptor Interacting Protein-1  
**RISC:** RNA Inducer Silencing Complex  
**RLR:** RIG-Like Receptors  
**RNAi:** RNA interference  
**RNS:** Reactive Nitrogen Species  
**ROS:** Reactive Oxygen Species  
**RT-qPCR:** Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction  
**Runx2:** Runt-related transcription factor 2  
**SDF-1:** Stromal cell-Derived Factor 1

**SHP:** Small Heterodimer Partner  
**SIDA:** Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis  
**siRNA:** small-interfering RNA  
**SIV:** Simian Immunodeficiency Viruses  
**SLE:** Systemic Lupus Erythematosus  
**SOCS:** Suppressor Of Cytokine Signaling  
**Sp:** Spermine  
**Spd:** Spermidine  
**STAT:** Signal Transducer and Activator of  
**STING:** STimulator of INterferon Genes  
**SW:** Syndrome de WHIM  
**Syk:** Spleen Tyrosine Kinase  
**TAA:** Tumor Associated Antigen  
**TBK:** TANK-Binding Kinase I  
**TCR:** T-Cell Receptor  
tetratricopeptide repeats  
**TGF:** Transforming Growth Factor  
**THD:** TNF Homology Domain  
**TICAM-I:** TIR domain-Containing Adapter  
Molecule I  
**TIR:** Toll IL-I Receptor

**TLR:** Toll-Like Receptor  
**TNF:** Tumor Necrosis Factor  
**TRADD:** TNF Receptor-Associated Death  
Domain  
**TRAF:** TNF Receptor-Associated Factor  
**TRAIL:** TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand  
Transcription  
**Treg:** Regulatory T lymphocytes  
**TRIM:** TRIPartite Motif  
**trmH:** Méthyltransférase  
**TYK:** TYrosine Kinase  
**UNC93BI:** Unc-93 homolog B  
**VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor  
**VIH:** Virus de l'ImmunoDéficiency Humaine  
**VISA:** Virus Induced Signalling Adaptor  
**VRE:** Virus-Responsive Elements  
**VSV:** Vesicular stomatitis Virus  
**VSV:** Vesicular Stomatitis Virus  
**WHIM:** Warts, Hypogammaglobulinemia,  
Infections, Myelokathexis  
**XIAP:** X-linked IAP



## LISTE DES FIGURES

### INTRODUCTION

Figure 1 :	Structure des Toll-Like Receptors.....	24
Figure 2 :	Trafficking des Toll-Like Receptors.....	27
Figure 3 :	La voie d'activation des pDC par les TLR en réponse aux acides nucléiques.....	32
Figure 4 :	La voie d'activation intracellulaire autre que TLR des pDC.....	38
Figure 5 :	La reconnaissance de l'ADN du soi.....	43
Figure 6 :	La voie de signalisation de l'IFN de type I.....	48
Figure 7 :	Mécanisme intracellulaire utilisant les ISG contre les virus.....	54
Figure 8 :	Les cellules et les tissus qui expriment TRAIL.....	55
Figure 9 :	Identification des cellules dendritiques plasmacytoïdes en cytométrie en flux.....	62
Figure 10 :	Développement des pDC dans la moelle osseuse.....	64
Figure 11 :	Les récepteurs régulateurs des pDC et la voie de signalisation des ITAM régulatrice des TLR.....	73
Figure 12 :	Les pDC sont le lien entre l'immunité innée et adaptative.....	75
Figure 13 :	Les principaux effets physiologiques et pathologiques des membres de la superfamille du TNF.....	75
Figure 14 :	L'interféron de type I pendant l'infection virale.....	77
Figure 15 :	L'interféron de type I persistant pendant l'infection virale chronique induit la voie de signalisation de l'immunosuppression.....	78
Figure 16 :	L'interféron de type I pendant l'infection virale aiguë induit l'expression du ligand pro-apoptotique TRAIL.....	79
Figure 17 :	Les niveaux d'IFN-I, de la charge virale et des lymphocytes T CD4+ durant les différentes phases de l'infection par le VIH.....	80
Figure 18 :	Mécanismes d'action de l'interféron pendant les infections bactériennes.....	83
Figure 19 :	Mécanismes de la réaction allergique.....	85
Figure 20 :	Contribution de l'IFN-I dans les thérapies anticancéreuses dans des lésions malignes.....	89
Figure 21 :	La voie de TRAIL/DR5 dans les essais cliniques.....	91
Figure 22 :	La voie des pDC et de l'IFN-I dans les maladies auto-immunes.....	94
Figure 23 :	Les différentes protéines des pDC qui ont été ciblées dans des essais cliniques contre le SLE.....	99
Table I :	Caractéristiques des lignées cellulaires des pDC.....	66

### RÉSULTATS

Table R1 :	L'expression et la voie de signalisation des récepteurs à l'histamine.....	111
------------	--	-----

### DISCUSSION

Figure D1 :	Marqueur d'activation des pDC en présence de FFN-511 ou de CB.....	183
Figure D2 :	Présence tissulaire et cellulaire d'ARNm de CXCR4.....	184
Figure D3 :	Structure monomérique et dimérique de CXCR4 selon le modèle 3ODU.....	185
Figure D4 :	Mode de fixation de IT1t et de CXCL12 sur CXCR4.....	187
Figure D5 :	Structure de l'AMD3100.....	188
Figure D6 :	Structure de l'IT1t.....	190
Figure D7 :	Résidus de CXCR4 interagissant avec l'antagoniste AMD3100.....	190
Figure D8 :	Heat Map.....	191
Figure D9 :	Poche d'interaction de l'AMD3100 et des amines se chevauchent dans CXCR4...	192

<u>Figure D10</u> :	Duolink entre MyD88 et IRF7.....	195
<u>Figure D11</u> :	Expression membranaire des récepteurs à l'histamine sur les pDC primaires.....	196
<u>Figure D12</u> :	CXCL12 permet d'inhiber l'effet du CB.....	197
<u>Figure D13</u> :	Mécanisme d'activation des protéines G.....	202
<u>Figure D14</u> :	La famille de PI3K comprend plusieurs classes et isoformes.....	203
<u>Figure D15</u> :	Rôle divergent des sous-unités catalytiques et régulatrices des différentes isoformes en fonction du signal.....	203
<u>Figure D16</u> :	Désensibilisation des GPCR médiée par les $\beta$ -arrestines.....	204
<u>Figure D17</u> :	Nouveau rôle de la $\beta$ -arrestine en tant qu'adaptateur d'endocytose et de la voie de signalisation des GPCR.....	205
<u>Figure D18</u> :	Les voies de signalisation de CXCR4.....	206
<u>Figure D19</u> :	Induction des différentes voies de signalisation par des ligands biaisés.....	207
<u>Figure D20</u> :	Le lysotracker indique qu'il n'y a plus d'acidification des endosomes dans les monocytes et les pDC stimulées par un virus après pré-incubation avec des amines.....	210
<u>Figure D21</u> :	Localisation de FFN-511 dans des cellules non stimulées (A) ou stimulées avec du VIH (B).....	211
<u>Figure D22</u> :	Intérêt de la technologie ON-TARGET <sup>plus</sup> .....	217
<u>Figure D23</u> :	Les voies de l'endocytose ou de l'infection par le VIH dans les pDC.....	221

## **ANNEXE**

<u>Figure A1</u> :	Mécanisme intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.....	231
<u>Figure A2</u> :	Les ligands et les récepteurs de la superfamille du TNF.....	233
<u>Figure A3</u> :	TRAIL induit la formation du DISC.....	235
<u>Figure A4</u> :	Structure cristallographique de TRAIL selon le modèle ID0G.....	237
<u>Figure A5</u> :	Les récepteurs de TRAIL.....	238
<u>Figure A6</u> :	L'interaction entre TRAIL et ses récepteurs de mort.....	239
<u>Table A1</u> :	Les composés de la famille des imidazo[1,2-a][1,3,5]triazines testés lors des différentes études.....	245

## PRÉFACE

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) représentent la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes et établissent le lien essentiel entre l'immunité innée et adaptative. Les pDC endocytent et détruisent les particules virales et ainsi détectent leur matériel génétique grâce à des senseurs antiviraux de la famille des Toll-Like Receptors (TLR). Pour cela, les pDC expriment notamment les TLR7 et 9 qui répondent spécifiquement et respectivement aux simples brins d'ARN et à l'ADN. L'activation des TLR7/9 induit la production massive d'interféron de type I (IFN-I) et des cytokines pro-inflammatoires. L'IFN-I est un antiviral puissant, indispensable au contrôle de la propagation virale lors des phases aiguës de l'infection. Cependant, l'IFN-I peut s'avérer avoir des effets délétères dans un grand nombre d'infections chroniques et de maladies auto-immunes. Ainsi, il semble indispensable de découvrir les mécanismes régulateurs des pDC ainsi que des modulateurs de l'activation des pDC. Nous nous sommes intéressés au rôle de différentes amines dans l'activation des pDC ainsi que leur mécanisme de régulation qui utilise l'engagement de CXCR4 (C-X-C chemokine receptor).

Nous avons ainsi montré que les monoamines (histamine, dopamine, sérotonine) et les polyamines (spermine et spermidine) inhibent l'activation complète des pDC stimulées par divers virus et que la fonction amine de ces molécules est indispensable à leur activité. Par la suite, nous avons identifié CXCR4 comme étant le récepteur indispensable à l'activité inhibitrice des amines sur les pDC. Ainsi nous avons pu montrer que les amines pouvaient réguler les pDC en passant par CXCR4 et que ce récepteur était un interrupteur d'activation potentiel des pDC lors des infections virales.

La transfection de cellules primaires est difficile, la transfection de pDC primaires est presque impossible. Les pDC sont des

En effet, les pDC sont (1) des cellules extrêmement rares (moins de 1% des PBMC (Peripheral blood mononuclear cells)) et fragiles, qui ne peuvent pas être gardés en culture plus de 48h, (2) des cellules avec une grande activité d'endocytose et (3) spécialisées dans la reconnaissance des ARN et des ADN. Nous avons voulu mettre au point la transfection de siRNA dans des pDC primaires humaines. Cette technique permettrait dans un premier temps d'étudier des protéines spécifiques dans les pDC et mieux comprendre leur fonctionnement. D'autre part, la mise en place du siRNA dans les pDC permettrait d'affiner notre étude sur les amines et découvrir leur cible et leur mécanisme dans l'objectif d'élaborer de nouvelles solutions thérapeutiques qui pourraient être utilisées localement dans des pathologies qui nécessitent la modulation des pDC.



D'autre part, nous avons détecté des cellules géantes multi-nucléaires en forme de « roue de bicyclette » lorsque les pDC sont cultivées *in vitro* avec de grandes quantités de virus VIH. Ainsi, comme les monocytes et les macrophages, les pDC peuvent former *in vitro* des cellules géantes multi-nucléaires exprimant de hauts niveaux de protéines virales p24 de VIH-1. Cependant, les pDC ne sont que très peu infectées (moins de 5%). Nous nous sommes alors demandé si le corécepteur CXCR4 du virus VIH était aussi important que le récepteur CD4 pour la reconnaissance de ce dernier lors de l'activation des pDC.

# **INTRODUCTION**



# I. LES RÉPONSES DE L'IMMUNITÉ INNÉE

## I. A. RÉPONSES ANTIVIRALES DES CELLULES DENDRITIQUES PLASMACYTOÏDES (pDC) APRÈS RECONNAISSANCE DES PATHOGÈNES

Le système immunitaire est capable de reconnaître les motifs moléculaires associés aux pathogènes, les PAMP (pathogen-associated molecular pattern). Les récepteurs responsables de cette reconnaissance sont donc les PRR (Pattern Recognition Receptors) (Medzhitov and Janeway, 1997a). Parmi les PRR, il existe trois catégories :

\* Des récepteurs membranaires ou endosomaux : les récepteurs de type Toll, les Toll-Like Receptors (TLR). Ce sont des récepteurs qui ont été très bien conservés dans l'évolution, homologues chez les mammifères et initialement décrits chez la *Drosophila*, et qui sont des éléments importants de reconnaissance des pathogènes (Akira, 2006).

\* Des récepteurs cytosoliques : constitués d'un ensemble hétérogène de récepteurs aux PAMP comprenant notamment les membres de la famille des RLR (RIG-Like Receptors), la PKR (Protein kinase RNA-activated) et les OAS (2'-5'-oligoadénylate synthase) inductibles par l'IFN, et les NLR (NOD-Like Receptors) (Janeway and Medzhitov, 2002; Medzhitov and Janeway, 2002). Il a aussi été démontré plus récemment qu'une nouvelle famille pouvait reconnaître les PAMP, les récepteurs AIM-2 Like Receptors (ALR) ainsi que la protéine adaptatrice STING (Stimulator of Interferon Genes).

\* D'autre part, un récepteur supplémentaire a été identifié : le récepteur RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-products), de la superfamille des immunoglobulines.

Il a été montré que les pDC possédaient des membres de chaque type de récepteurs qui vont être détaillés par la suite.

### I. A. I. La voie endosomale de la famille des Toll-Like Receptors (TLR)

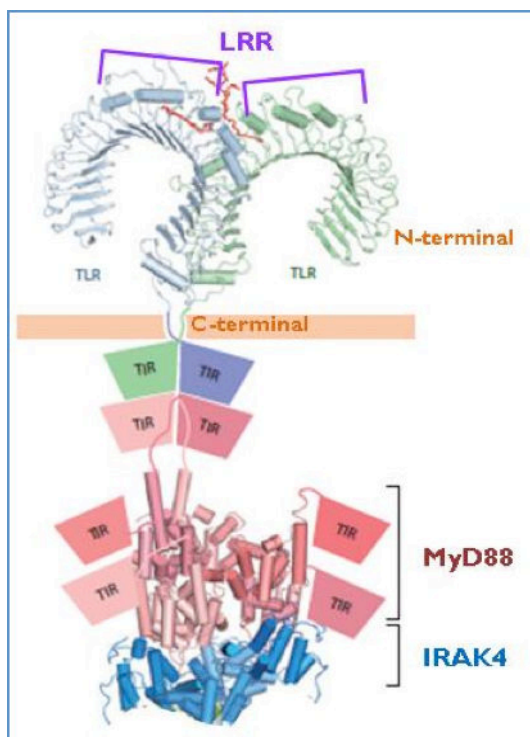
#### I. A. I. i. Généralités sur les TLR

La découverte des TLR humains par Jules Hoffman (découverte du Toll en 1996 chez la *drosophile*) (Lemaitre *et al.*, 1996) et Bruce Beutler (découverte du premier ligands LPS du TLR4) (Poltorak *et al.*, 1998) en 1997 a été d'une importance majeure dans la recherche en immunologie et leur a valu d'être tous deux récompensés par le Prix Nobel de Médecine et Physiologie en 2011 (Medzhitov and Janeway, 1997b). En effet, les TLR jouent un rôle crucial dans la détection des

infections virales et microbiennes. On connaît à ce jour 10 TLR chez l'homme, membranaires (TLR1, 2, 4, 5) ou endosomaux (TLR3, 7, 8, 9), qui reconnaissent spécifiquement divers composants issus des pathogènes, les PAMP (Takeda *et al.*, 2003). Ces TLR sont exprimés de façons différentes par les cellules mais ils présentent des homologies entre eux et traduisent majoritairement un signal aboutissant à des effets allant de la sécrétion d'IFN de type I à la production de chimiokines pro-inflammatoires. De plus, les TLR sont induits dans les cellules présentes dans les compartiments et tissus engagés dans la réponse immune.

Les pDC quant à elles expriment les TLR7 et 9 endosomaux à un niveau élevé qui vont reconnaître respectivement les ARN simple brin et les ADN double brin (Hemmi *et al.*, 2002 ; Kadowaki *et al.*, 2001 ; Krug *et al.*, 2001). Par ailleurs, les gènes codant pour les TLR sont positionnés à différents endroits du génome, mais certains sont regroupés (TLR7 et 8 sur le chromosome X par exemple).

#### I. A. I. ii. Structure des TLR



**Figure 1 : Structure des Toll-Like Receptors.** Les TLR sont sous forme de dimères. Ils sont composés d'un nombre variable de LRR. Le côté C-terminal est du côté intracellulaire et est composé par le domaine TIR, qui peut alors interagir avec le domaine TIR de MyD88, qui recrute alors IRAK4. Modifié à partir de (Kang and Lee, 2011)

Les TLR sont des protéines transmembranaires de type I fidèlement conservées au cours de l'évolution (Akira, 2001; Medzhitov, 2001). Chaque TLR contient un domaine extracellulaire, du côté N-terminal, riche en séquences répétées de leucine, les LRR (leucine-rich domain) qui participent à la reconnaissance du ligand (Akira, 2006; Akira and Takeda, 2004; Uematsu and Akira, 2007) , un domaine à hélice transmembranaire et un domaine intracellulaire, en C-terminal, contenant une région appelée Toll IL-1 Receptor (TIR), requise pour l'initiation de la signalisation

intracellulaire. Ce domaine TIR est une structure que partagent tous les TLR. Le domaine TIR recrute les protéines adaptatrices MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) ou TRIF afin d'engager une réponse immunitaire. L'activation du domaine TIR nécessite la dimérisation du TLR en formant un hétérodimère (TLR1/2 par exemple) ou un homodimère (TLR4/4), mais l'association dimérique de tous les TLR reste à ce jour non élucidée (Zhang *et al.*, 2002).

Les dimères de TLR ont tous une forme de fer à cheval et chaque monomère se superpose afin d'interagir par leur LRR. Cependant, ils subissent de très importants changements conformationnels lors de l'interaction avec le ligand. En effet, la fixation du ligand a tendance à refermer le fer à cheval, ce qui implique que les deux extrémités C-terminales de chaque monomère se rapprochent, ce qui va permettre la dimérisation de domaine TIR et induire le signal.

Les études cristallographiques des domaines extracellulaires des TLR avec leurs ligands restent un domaine de recherche très actif. Pour la première fois en 2005, Choe *et al.* et Bell *et al.* ont cristallisé le domaine extracellulaire de TLR3 (Bell *et al.*, 2005; Choe *et al.*, 2005). Par la suite, plusieurs structures d'agonistes de TLR ont été résolues (hétérodimère TLR1/2-lipopeptide, hétérodimère TLR2/6-lipopeptide, TLR3-dsRNA, TLR4-MD-2-LPS). En 2013, l'équipe de Shimizu a cristallisé TLR8 avec différents ligands (CL097, CL095 et R848) et encore plus récemment en mai 2015, l'équipe est parvenue à co-cristalliser TLR9 avec des ADN agonistes et antagonistes (Ohto *et al.*, 2015; Tanji *et al.*, 2013).

#### I. A. I. iii. Le trafficking des endosomes après stimulation

Les TLR7 et TLR9 sont exprimés dans les endosomes des pDC et des lymphocytes B. La reconnaissance des virus à ARN simple brin (TLR7) et à ADN (TLR9) par ces TLR ne nécessite pas une réplication virale active (Beignon *et al.*, 2005; Diebold *et al.*, 2004 ; Hochrein *et al.*, 2004 ; Lund *et al.*, 2003 ; Lund *et al.*, 2004 ).

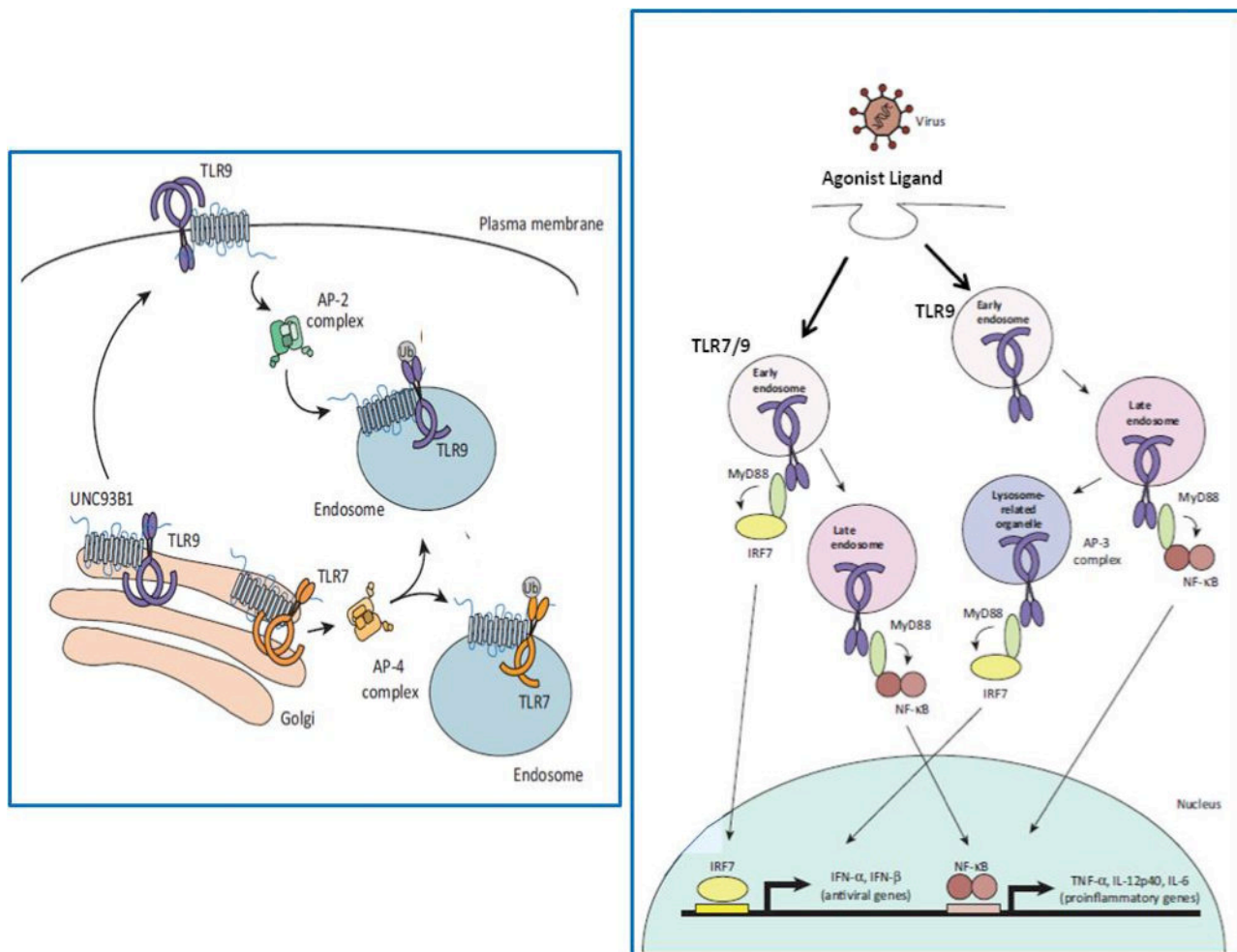
En effet, les virus à ADN et à ARN simple brin se lient par leur récepteur spécifique aux cellules, puis sont internalisés et incorporés dans un endosome précoce qui possède un pH légèrement acide. Les ligands vont alors être séparés de leur récepteur qui va être recyclé à la surface des pDC. L'endosome précoce se transforme en endosome tardif, qui présente un pH plus acide avant de transférer son contenu dans des lysosomes à pH très acide (O'Brien *et al.*, 2011 ; Pryor and Luzio, 2009). L'acidification des endosomes va permettre la destruction des particules virales et le relargage du matériel génétique qui va alors pouvoir interagir avec leur récepteur Toll-Like. On peut remarquer que pour ne pas confondre les acides nucléiques étrangers et ceux

de l'hôte, les TLR7 et 9 vont agir à l'intérieur du compartiment endosomal, dans lequel il n'y normalement pas de matériel génétique de l'hôte.

#### I. A. I. iv. Le trafficking des TLR endosomaux des pDC, TLR7 et TLR9

Les TLR sont synthétisés et stockés dans le RE (Réticulum Endoplasmique) puis sont rapidement transférés dans les endosomes avant la stimulation de la cellule, en transitant par le Golgi afin de subir les modifications post-transcriptionnelles essentielles à leur fonctionnement, comme la glycosylation (Chockalingam *et al.*, 2009). La conformation initiale des TLR dans l'ER est acquise grâce à des protéines chaperonnes de la famille de Hsp90 (Heat Shock Protein) et de PRTA4A, qui interagissent nécessairement ensemble afin que les TLR adoptent la conformation correcte en vue d'être fonctionnels (Kim *et al.*, 2008). UNC93BI (Unc-93 homolog B), une protéine résidant dans l'RE, se lie au domaine transmembranaire des TLR endosomaux et permet qu'ils sortent de l'RE et qu'ils migrent dans les endosomes (Brinkmann *et al.*, 2007). De façon intéressante, il a été montré qu'il existait une compétition entre TLR7 et TLR9 pour leur fixation au N-terminal d'UNC93BI, et que TLR9 s'y associe plus fortement que TLR7, ce qui résulterait en une accumulation de TLR9 plus importante dans les endosomes (Melchjorsen *et al.*, 2005). En plus d'UNC93BI, le déplacement de TLR7 et TLR9 dans les pDC dépend du recrutement des protéines adaptatrices de type clathrine (AP-2, AP-3 et AP-4) (Eberle *et al.*, 2009 ; Yoo *et al.*, 2014). Lee *et al.*, ont montré en 2013 que le déplacement et l'adressage de TLR7 et de TLR9 étaient distincts (Kariko *et al.*, 2005). Pour TLR9, UNC93BI reste associé à sa protéine cargo, se déplace jusqu'à la membrane cellulaire avec TLR9 où il va s'associer à AP-2 par un motif YXXF. Le recrutement de AP-2 est essentiel à l'internalisation de TLR9 vers les endolysosomes (caractérisé par les marqueurs LAMP-1 et LAMP-2 (lysosomal-associated membrane protein)). D'autre part, TLR7 utilise AP-4 pour se déplacer directement du Golgi vers les endosomes précoces (caractérisé par EEA1 (Early Endosome antibody 1) et VAMP1 (vesicle-associated membrane protein 3)). Ces résultats suggèrent que TLR7 et TLR9 sont délivrés dans différents compartiments, ce qui à pour conséquence un accès aux ligands des TLR différents ainsi que des voies de signalisation différentes. Une fois dans les endosomes, TLR9 (et peut être aussi TLR7) vont se déplacer dans des endosomes spécialisés dans la production de l'IFN-I, les ISC (interferon signaling compartiment) (Kariko and Weissman, 2007) grâce à AP-3 qui interagit avec TLR9. Lee et Barton ont donc proposé un modèle de déplacement des TLR au sein des endosomes (Lee and Barton, 2014). Ils suggèrent qu'il existerait deux voies de signalisation indépendante pour TLR7 et pour TLR9. (1) TLR7 se situe dans des endosomes couplés au complexe MyD88-IRF7, ce qui permet d'activer la voie des ISG (Interferon stimulated gene) après stimulation virale. Ces endosomes

précoces évoluent en endosomes tardifs couplés à MyD88-NF- $\kappa$ B (Nuclear factor-kappa B) pour induire les cytokines pro-inflammatoires. (2) TLR9, en surface, va être endocyté pour être activé et directement se retrouver dans des endosomes tardifs couplé à MyD88-NF- $\kappa$ B avant d'être transporté par AP-3 vers les lysosome-related organelle (LRO) spécialisé dans l'activation des gènes de l'IFN $\alpha$  (Guiducci *et al.*, 2006 ; Honda *et al.*, 2005 ; Kawai *et al.*, 2004; Sasai *et al.*, 2010 ).



**Figure 2 : Trafficking des Toll-Like Receptors.** TLR7 recrute AP-4 pour être déplacé dans des endosomes précoces associés à MyD88 qui va alors recruter IRF7 afin d'induire la voie des IFN. Les endosomes précoces vont se transformer en endosomes tardifs qui vont activer la voie de NF- $\kappa$ B. D'autre part TLR9, va utiliser UNC93B1 qui va l'envoyer à la membrane avant de recruter AP-2 pour aller directement dans des endosomes tardifs associés à NF- $\kappa$ B. AP-3 transporte alors TLR9 dans des lysosome-related organelle (LRO) qui induisent la voie de l'IFN-I. *Modifié à partir de (Lee and Barton, 2014)*

Les TLR ne sont activés dans les endosomes qu'après acidification de ces derniers. En effet, il a été montré que la réponse TLR devient inexistante après blocage de l'acidification du compartiment de l'endosome par la chloroquine ou la bafilomycin A1 (Persson *et al.*, 1997). Ainsi, la maturation des endosomes permet la digestion des micro-organismes conduisant au relargage de leur matériel génétique qui devient alors accessible aux TLR. Par ailleurs, l'ectodomaine de



TLR7 et de TLR9 est clivé par des protéases, ce qui n'est pas nécessaire à la fixation du ligand mais qui est indispensable au recrutement de MyD88 qui permettra d'assurer la transduction du signal (Ewald *et al.*, 2008 ; Park *et al.*, 2008). Enfin, l'acidification des endosomes d'augmenterait également l'affinité entre le ligand et TLR (Sioud *et al.*, 2007).

#### I. A. I. v. Le TLR7

##### I. A. I. v. a. Ligands naturels

Les ligands naturels de TLR7 ont été identifiés comme étant les ARN simple-brin riches en guanosine et en uridine (Diebold *et al.*, 2004 ; Heil *et al.*, 2004 ; Lund *et al.*, 2004). Le TLR7 reconnaît les virus à ARN simple-brin comme le virus VIH (virus de l'immunodéficience humaine), la grippe (Diebold *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004), le virus de Sendai (Melchjorsen *et al.*, 2005) et le VSV (vesicular stomatitis virus). La taille minimale de l'ARN pour une stimulation efficace est encore débattue, mais une séquence de 21 nucléotides semble suffisante (Hornung *et al.*, 2005).

TLR7 ne reconnaît pas seulement les ARN simple brin ; la complexité structurale de l'ARN est aussi importante pour leur reconnaissance par TLR7. En effet, TLR7 peut reconnaître un ARN qui forme une structure complexe : l'ARN de transfert (ARNt). Ce dernier possède un seul brin d'ARN qui se replie intramoléculairement par complémentarité des bases et forme une structure à trois-dimensions complexes.

Il a aussi été montré que le TLR7 pouvait reconnaître l'ARN relargué par des bactéries phagocytées (Eberle *et al.*, 2009) ainsi que certains complexes ribonucléoprotéiques de l'hôte, ce qui peut avoir des conséquences pathologiques.

##### I. A. I. v. b. Ligands synthétiques

Des ARN simple brin viraux purifiés ou des ARN simple brin synthétiques, complexés avec des lipides cationiques pour les protéger de la dégradation et faciliter leur internalisation, peuvent avoir le même effet que les virus. Il est maintenant clair que certains motifs nucléotidiques sont spécifiques de l'activation des TLR7. En effet les ARN simple brin contenant des séquences poly(U) ou riches en GU (au moins deux U à la suite - UUUU, GUUC, UUGU, GUUU, UUUC, UGUU, or UCUC), qui peuvent être présents dans les ARN viraux, induisent très efficacement la production d'IFN-I (Forsbach *et al.*, 2008).

Par ailleurs, Hemmi *et al.* ont démontré que le TLR7 humain étaient impliqués dans la reconnaissance de petites molécules : les imidazoquinolines (une famille de petites molécules

antivirales synthétiques) comme l'imiquimod (R837) et le résiquimod (R848) (Hemmi *et al.*, 2002). De plus, Lee *et al.* ont rapporté que les analogues de la guanosine, comme la loxoribine, activaient les cellules immunitaires *via* TLR7 (Lee *et al.*, 2003). Plus récemment, Yoo *et al.* ont réalisé une étude approfondie de type QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) sur un grand nombre de molécules de la famille des quinoléines et des pyridines, ce qui a permis de déterminer plus précisément le squelette moléculaire et les fonctions essentielles à l'activation de TLR7 (Yoo *et al.*, 2014).

#### I. A. I. v. c. Discrimination entre l'ARN du non soi et du soi

Comme démontré précédemment, TLR7 est capable de reconnaître l'ARN simple brin viral ou bactérien. Mais, il a aussi été montré qu'il peut reconnaître des structures ARN du soi lors de certaines pathologies. L'activation de TLR7 ne dépendrait donc pas de l'origine de l'ARN et il pourrait se lier à tout type d'ARN, même du soi (ARNm, ARNt, ARNr...). L'incorporation de modifications dans la séquence nucléotidique de l'ARN du soi est donc essentielle pour éviter leur reconnaissance par les TLR7. Les modifications post-transcriptionnelles jouent un rôle important dans la discrimination des ARN du soi. Ces modifications sont abondantes sur les ARN eucaryotes par rapport aux ARN bactériens et mitochondriaux. Par exemple, 25% de tous les nucléotides de l'ARNt ont subi des modifications. Kariko *et al.* ont par ailleurs fait une corrélation entre le nombre de modifications et l'efficacité de la stimulation : moins il y a de modifications sur l'ARN, plus la stimulation va être importante (Kariko *et al.*, 2005 ; Kariko and Weissman, 2007). Les ARNt ne sont pas complexés dans la cellule et donc plus à-même de stimuler TLR7. Cependant, ils subissent d'importantes modifications, comme les méthylations, qui sont impliquées dans leur stabilité et leur reconnaissance. L'une des plus importante méthylation de l'ARNt est probablement la méthylation de la guanosine en position 18 par la Gm18-2'O-méthyltransférase (trmH) (Persson *et al.*, 1997). Il a été montré que cette méthylation avait un effet inhibiteur de l'activation de TLR7 (Sioud *et al.*, 2007). On peut remarquer que pour échapper au système immunitaire, certains ARNt de la bactérie *E. coli* porte cette méthylation. En plus de ne pas avoir d'action activatrice, ces ARNt bactériens seraient également capables d'inhiber l'activation de TLR7 par d'autres ARN (Rimbach *et al.*, 2015).

D'autre part, pour éviter que les ARN de l'hôte stimulent les TLR lors de la phagocytose de virus ou de corps apoptotiques, les ARN du soi, qui ne sont pas protégés par une capsidie ou une enveloppe, sont rapidement dégradés dans les RNases et atteignent très rarement le compartiment endosomal.

## I. A. I. vi. Le TLR9

### I. A. I. vi. a. Ligands naturels et synthétiques

TLR9 reconnaît des structures présentes dans l'ADN des mycobactéries (ADN double brin) que l'on appelle les séquences CpG (séquence : nucléotide cytosine - phosphate - nucléotide guanine), principalement non méthylées, connues pour leur capacité stimulatrice du système immunitaire. Les motifs CpG sont 4 fois plus présents dans l'ADN bactérien ou viral que dans l'ADN de mammifère. TLR9 est donc capable de reconnaître des virus à ADN, comme le mouse cytomegalovirus (MCMV) et les herpès virus 1 et 2 (HSV) (Lund *et al.*, 2003). Ces ADN induisent un éventail de réponses immunitaires par les cellules impliquées dans la reconnaissance de ces molécules. Le TLR9 se lie directement aux ADN CpG ou aux ODN CpG (oligodéoxynucléotides – ADN synthétique) (séquence : déoxynucléotide-cytosine-triphosphate-phosphodiester déoxynucléotide guanine triphosphate). L'ADN CpG peut être simple ou double brin, mais l'ODN a une activité immunostimulatrice plus puissante lorsqu'il est non-méthylé et simple brin (Rutz *et al.*, 2004; Zelenay *et al.*, 2003). Le TLR9 reconnaît ainsi différents motifs CpG, mais les séquences optimales sont 5'-GTCGTT (Bauer *et al.*, 2001). Cependant, une étude plus récente a montré que les CpG non-méthylés, qui sont la signature des bactéries, ne représentaient pas la séquence idéale pour leur reconnaissance, mais que la reconnaissance de l'ADN par TLR9 dépendait de la présence du squelette 2'-déoxyribose phosphate. Les motifs CpG sont uniquement plus stables, mieux agrégés et sont plus affins à la capture par les cellules que les autres types d'ADN, ce qui les rend de meilleurs stimulants. Ainsi, seule la localisation de l'ADN, dans le bon compartiment où est présent TLR9, plutôt que la séquence, l'origine, la structure double brin ou simple brin, est indispensable à son activation (Haas *et al.*, 2008 ; Yasuda *et al.*, 2006). Pour autant, les ODN CpG sont très utilisés pour la stimulation et l'étude de TLR9 pour mimer l'effet de l'ADN viral et bactérien.

Il existe trois types d'ODN CpG : les CpG de type A (CpG<sub>A</sub>) sont caractérisés par une queue polyG, un squelette phosphorothioate-phosphodiester qui va favoriser la formation d'agrégats et ils induisent une forte sécrétion d'IFN-I à partir des endosomes précoces ; les CpG de type B (CpG<sub>B</sub>), plutôt sous forme de monomère linéaire avec un seul squelette phosphorothioate, induisent une faible production d'IFN-I et induisent plutôt la voie de maturation des pDC et la voie pro-inflammatoire (production d'IL-6 et de TNF (Tumor necrosis factor)) à partir de lysosomes ; et les CpG de type C (CpG<sub>C</sub>) qui ont des effets intermédiaires aux deux précédents (Verthelyi *et al.*, 2001). Les endosomes dans lesquels vont se situer les CpG dépendent de leurs séquences (Chinnathambi *et al.*, 2012).

Très récemment, il a été montré que TLR9 était capable de reconnaître des hybrides ARN:ADN (Rigby *et al.*, 2014).

#### I. A. I. vi. b. Discrimination entre l'ADN du non soi et du soi

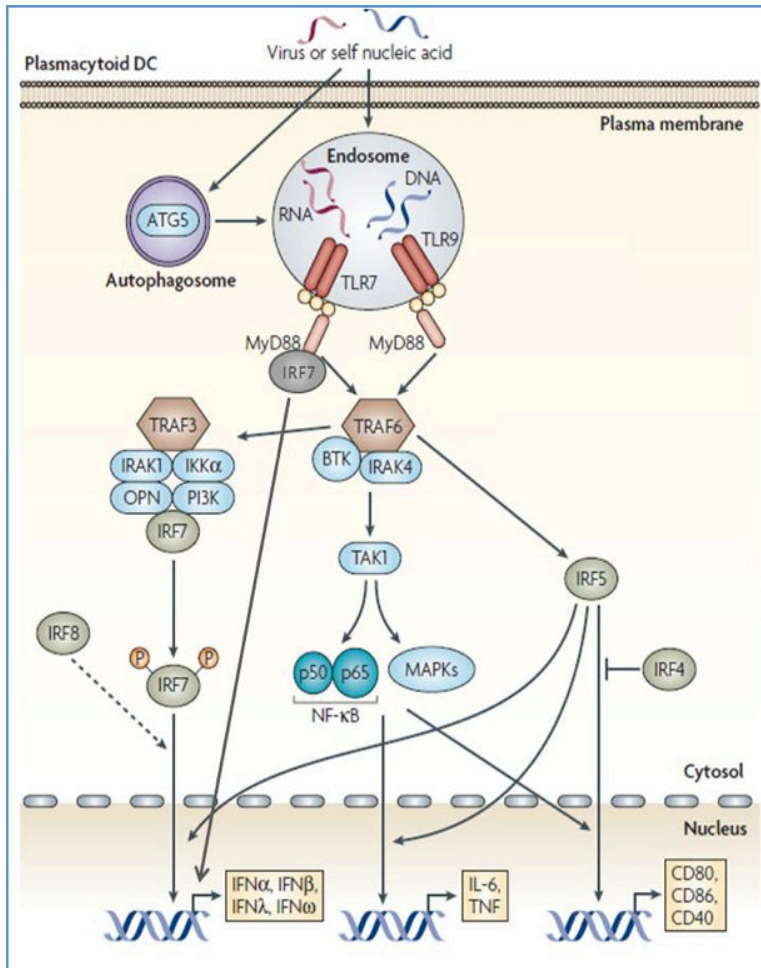
Le relargage de l'ADN du soi dans l'environnement extracellulaire est un phénomène commun dans la mort cellulaire apoptotique et nécrotique (Pisetsky and Fairhurst, 2007). Afin de préserver l'intégrité de l'organisme, il est absolument essentiel que le système évite la reconnaissance de cet ADN du soi extracellulaire, tout en conservant sa capacité à reconnaître les acides nucléiques des pathogènes. La discrimination entre les ADN des pathogènes et ceux du soi semble être contrôlée à trois niveaux différents. Tout d'abord, la localisation subcellulaire de TLR9 dans les endosomes permet la reconnaissance de l'ADN de pathogènes qui ont été internalisés par la cellule *via* les voies d'endocytose, alors que l'ADN du soi échoue à spontanément accéder à ce compartiment (Barton *et al.*, 2006). D'autre part, la forte concentration de DNases dans l'environnement extracellulaire assure une dégradation rapide de l'ADN de l'hôte qui a été relargué par des cellules mourantes mais pas de l'ADN qui est contenu dans un virus ou dans un microorganisme. Enfin, l'ADN viral ou bactérien contient un grand nombre de motifs CpG non-méthylés qui peuvent se fixer à TLR9, alors que l'ADN du soi possède très peu de ces motifs.

#### I. A. I. vii. Voies de signalisations intra-cytoplasmiques dépendantes des TLR

L'activité signalétique de TLR7 et TLR9 dépend totalement de la protéine adaptatrice MyD88 qui se fixe sur le dimère de TIR par des interactions homophiliques. La fixation des ligands sur les LRR intra-endosomaux de TLR7 et TLR9 induisent un changement conformationnel et une association des deux LRR des deux monomères et donc une dimérisation des domaines TIR cytoplasmiques (Latz *et al.*, 2007) ce qui va permettre l'induction du signal. MyD88 comporte des zones qui sont importantes pour le recrutement d'un TLR spécifique alors que d'autres zones sont requises pour la propagation du signal. Il est considéré comme un « adaptateur universel » car il est utilisé par tous les TLR à l'exception du TLR3.

Les voies de signalisation induites par les TLR7 et TLR9 peuvent se diviser en deux catégories : les voies dépendantes de la molécule adaptatrice MyD88 aboutissant à l'activation de NF- $\kappa$ B, et celles aboutissant à l'activation des IRF. Les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et IRF résident dans le cytoplasme sous formes inactives et sont transloqués dans le noyau après stimulation. Il n'est pas encore clair si ces deux types de signalisation, activation de la voie pro-inflammatoire et celle de la production de l'IFN-I, se produisent simultanément ou de façon

différée. Cependant, il semble que la conservation du complexe signalétique à l'intérieur d'un endosome précoce (caractérisé par le marqueur EEA-1), favorise le recrutement d'IRF7 et donc de l'induction de l'IFN-I, par rapport à un endosome tardif ou endolysosome ou encore lysosome, qui favorise la voie pro--inflammatoire (Chinnathambi *et al.*, 2012; Honda *et al.*, 2005 ).



**Figure 3 : La voie d'activation des pDC par les TLR en réponse aux acides nucléiques.** En présence de pathogènes ou d'agonistes, les TLR se relocalisent dans des endosomes. Les changements conformationnels de TLR permettent le recrutement de MyD88, TRAF6, BTK et IRAK4. Ce complexe active alors la voie d'IRF7, d'IRF5 et de NF-κB. Les facteurs de transcription vont alors induire la transcription des gènes cibles.  
Modifié à partir de (Gilliet *et al.*, 2008)

#### I. A. I. vii. a. Voie dépendante de MyD88 menant à l'activation du NF-κB

L'adaptateur MyD88 possède un domaine TIR dans son extrémité C-terminale et un domaine de mort (DD) du côté N-terminal qui interagit avec IL-1R-associated kinase-4 (IRAK-4) après stimulation. IRAK4 phosphoryle IRAK1 et IRAK2 qui vont eux même phosphoryler le TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) qui peut être inhibé par un autre membre de la famille de IRAK, IRAK-M. Le complexe MyD88, IRAK1 et TRAF6 se dissocie alors des TLR. TRAF6, une ubiquitine ligase E3, forme une chaîne polyubiquitine sur le modulateur essentiel de NF-κB, NEMO ou IKKγ. TRAF6 active le membre de la famille MAPKKK, TGFβ activated kinase I (TAK) qui s'associe avec deux protéines adaptatrices TAKI-binding proteins I (TAB1) et TAB2. TAB2 est un récepteur de la chaîne polyubiquitine sur TRAF6 et NEMO et colle ces deux protéines ensemble. TAK1 peut soit (1) phosphoryler IKKβ qui va phosphoryler IκB, ce qui va les dégrader et

engendrer la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B. Cette voie de signalisation est essentielle pour l'expression des gènes de cytokines inflammatoires, dont TNF $\alpha$ , IL-6 et IL-12, et des molécules de costimulation (Akira, 2006); (2) activer la cascade des mitogen-activated kinases (MAPK), en commençant par MAPKK3 et MAPKK6 menant à la phosphorylation des Jun kinases (JNK), p38 et CREB, ce qui va induire les kinases ERK1 et ERK2 (Extracellular signal-regulated kinases) et donc activer API (activator protein-1).

IRF5 s'associe directement au complexe MyD88 et TRAF6, ce qui va directement induire l'activation du facteur de transcription correspondant est induire les gènes de transcription des cytokines pro-inflammatoires (Schoenemeyer et al., 2005).

#### I. A. I. vii. b. Voie dépendante de MyD88 menant à l'activation des IRF

La signalisation des TLR7 et TLR9 induit, hormis les cytokines inflammatoires, de l'IFN de type I. Pour cela, TLR7 ou TLR9 recrute MyD88 et IRAK4, qui vont alors interagir avec IRAK1, TRAF6, TRAF3, IKK $\alpha$ , l'ostéopontine (OPN) et IRF7 (Shinohara et al., 2006). Finalement, IRAK1 et IKK $\alpha$  phosphorylent IRF7 ce qui induit une forte transcription des gènes de l'IFN-I et donc la production abondante d'IFN de type I. D'autre part, IRF7 colocalise avec MyD88 (alors que l'IRF3 ne l'est pas) (Honda et al., 2004 ; Kawai et al., 2004), et peut s'associer directement avec MyD88 ou TRAF6, formant un large complexe moléculaire qui mène à la production d'IFN de type I. IRF7 est indispensable à la production d'IFN-I. En effet, une étude récente a montré que les individus porteurs d'une mutation dans *IRF7*, qui le rendrait inactif, présentent des pDC dont la fonction est sévèrement altérée et sont particulièrement sensibles à l'infection par Influenza virus (Ciancanelli et al., 2015). Cependant, l'étude ne précise pas si le défaut fonctionnel des pDC est suffisant pour induire la susceptibilité à Influenza virus ou si IRF7 joue un rôle plus général dans la capacité des cellules à répondre au virus.

Tout comme pour la déficience en IRF7, une déficience en IRAK-1 ne conduit pas à une production défectueuse de cytokines inflammatoires, mais à une production défectueuse d'IFN $\alpha$  (Uematsu et al., 2005). Par ailleurs, la déficience en TRAF3 mène aussi à une production défectueuse d'IL-10, qui induit une surproduction de cytokines inflammatoires. Finalement, l'OPN contribue aussi à l'expression d'IFN-I dans les pDC (Shinohara et al., 2006). En effet, une déficience en OPN réduit la production d'IFN-I dépendante du TLR9 mais n'a pas d'effet sur l'expression et la transcription de cytokines pro-inflammatoires dépendantes de NF- $\kappa$ B.

### I. A. I. vii. c. Les IRF : facteurs de transcription impliqués dans l'activation des gènes de l'IFN-I

La famille des IRF comprend 9 membres d'IRF1 à IRF9 (détaillé dans la revue de Honda et *al.*, (Honda and Taniguchi, 2006)). Chaque IRF possède du côté N-terminal une séquence d'interaction à l'ADN, relativement bien conservée entre les IRF, la DBD (DNA binding domain) et du côté C-terminal un domaine d'association des IRF (IAD = IRF association domain) qui a un rôle dans l'interaction avec des co-activateurs transcriptionnels. La région centrale qui connecte le DBD et le IAD est le domaine PEST, normalement présent dans des protéines caractérisées par un renouvellement rapide.

La région DBD reconnaît une séquence d'ADN connue sous le nom d'IFN Stimulated Response Element (ISRE) ou plus récemment sous le nom d'IRF Response Elements (IRF-E). Les IRF-E sont présents dans le promoteur des gènes codant pour les IFN-I eux-mêmes, mais aussi dans les promoteurs d'autres gènes impliqués dans l'immunité. Quatre IRF (IRF1, IRF3, IRF5 et IRF7) ont été impliqués en tant que régulateurs positifs de la transcription des gènes de l'IFN de type I (Taniguchi et *al.*, 2001). Outre les sites de liaisons aux IRFs, le promoteur du gène *IFNB* contient également des sites de liaison pour le NF- $\kappa$ B et la protéine activatrice API (Taniguchi et *al.*, 2001). Ainsi, l'expression de l'IFN $\beta$  dépend de la coactivation des IRF3/7, de NF- $\kappa$ B et d'API.

La production de l'IFN $\alpha$  dépend en revanche de l'expression d'IRF7, mais ce facteur de transcription est absent de la plupart des cellules au repos mais est induit par les IFN-I. Ainsi, pour pouvoir produire de l'IFN $\alpha$ , les cellules doivent avoir au préalable été incubées en présence d'IFN-I. De façon intéressante, les pDC expriment constitutivement IRF4, IRF7 et IRF8 et cette grande quantité d'IRF7 endogène facilite la synthèse rapide IFN $\alpha$ . De ce fait, les pDC n'ont pas besoin d'être stimulées par des IFN-I pour sécréter de l'IFN $\alpha$ . Il a récemment été montré que les pDC expriment de faibles niveaux du répresseur translationnel, 4E-BP, qui est responsable de la régulation d'IRF7, ce qui pourrait expliquer l'expression constitutive d'IRF7 dans les pDC (Colina et *al.*, 2008). IRF8 peut, lui, amplifier la réponse IFN pendant la deuxième phase de la transcription des gènes IFN-I dans les pDC. Hormis IRF7, IRF5 peut aussi interagir directement avec MyD88 et induire les IFN-I et des cytokines pro-inflammatoires après l'activation de TLR. IRF4 est en compétition avec IRF5, mais pas avec IRF7 pour se fixer à MyD88, ce qui a pour conséquence une régulation négative de la production de cytokines induite par une stimulation des TLR (Negishi et *al.*, 2005). Il a été montré que l'induction de l'IFN-I était normale dans des pDC déficientes en IRF1 et IRF5 et que donc la robustesse de la production en IFN-I dépendait de la présence d'IRF3 et d'IRF7.

La compréhension de la divergence de signalisation à partir de MyD88 après une

stimulation de TLR qui engage la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, IRF7 ou IRF5 n'est pas complètement établi. Cependant, il est clair que la signalisation de TLR n'est pas uniquement due à l'interaction avec une des molécules adaptatrices. En effet, la formation du complexe multimoléculaire entre le ligand et le récepteur fixé à MyD88 permet le positionnement spécifique des molécules de signalisation ce qui va définir l'amplitude, la durée et le type de la voie de signalisation engagée.

- IRF3 et IRF7

IRF3 et IRF7, qui sont hautement homologues, sont des régulateurs clés de l'expression de gènes de l'IFN de type I induite par les virus. IRF3 est lui exprimé constitutivement contrairement à IRF7. La liaison des IFN de type I à leur récepteur IFNAR aboutit à l'activation d'un activateur transcriptionnel hétérotrimérique connu sous le nom de ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3). ISGF3 est composé par IRF9, STAT1 et STAT2 (Signal Transducer and Activator of Transcription), et est responsable de l'induction du gène IRF7 (Marie *et al.*, 1998 ; Sato *et al.*, 1998). IRF3 et IRF7 résident dans le cytosol sous une forme latente et, après une infection virale, vont être phosphorylés sur des résidus sérines dans la région C-terminale, région régulatrice, ce qui va permettre leur dimérisation et leur translocation dans le noyau.

La phosphorylation en deux étapes est le modèle suggéré pour IRF3. La première phosphorylation permet l'interaction avec le co-activateur CBP (Yoneyama *et al.*, 1998). CBP facilite alors la phosphorylation du deuxième site, ce qui va permettre la dimérisation du TLR. Ainsi, l'holocomplexe contenant IRF dimérisé et CBP est formé dans le noyau et se lie à la cible ISRE de la séquence d'ADN sur le promoteur des gènes IFN-I et de certaines cytokines. Ce complexe fixé à l'ADN (appelé aussi enhanceosome) est plus stable et plus efficace pour induire la transcription de tous ces éléments de façon individuelle (Wathelet *et al.*, 1998). Il a pu être mis en évidence qu'IRF3 pouvait former un complexe avec la sous unité p65 de NF- $\kappa$ B. De cette façon, IRF3 peut fonctionner comme un promoteur et cofacteur spécifique de l'activation de la transcription de gènes dépendants de la voie NF- $\kappa$ B, sans se fixer à un ISRE (Wietek *et al.*, 2003). Cependant, p65 n'est pas indispensable pour l'activité d'IRF3 en réponse à un ligand sur TLR7 ou 9.

IRF7 peut former un homodimère ou un hétérodimère avec IRF3 et ces dimères ont des rôles différents sur l'expression des membres de la famille de l'IFN-I. IRF3 est un puissant activateur du gène *IFNB* mais pas des gènes *IFNA*, à l'exception de *IFNA4*, alors que l'IRF7 active efficacement à la fois les gènes *IFNA* et *IFNB* (Marie *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2000 ; Sato *et al.*, 1998 ). IRF3 est donc principalement responsable de l'induction initiale du gène *IFNB*, alors que l'IRF7, dont l'augmentation de l'expression passe par les IFN de type I eux-mêmes, est impliqué dans la phase tardive de l'induction des gènes de l'IFN de type I. IRF7 est crucial pour la voie cytosolique d'induction des gènes de l'IFN-I par les virus alors que la contribution de l'IRF3 est mineure en



l'absence d'IRF7 (Honda *et al.*, 2005). De plus, comme il a été démontré précédemment, IRF7 peut interagir avec la molécule adaptatrice TRAF6 mais aussi directement avec MyD88 (Honda *et al.*, 2004 ; Kawai *et al.*, 2004), ce qui explique probablement le fait que les pDC soient capables d'induire de telles quantités d'IFN comparativement aux autres types cellulaires. L'un des mécanismes le plus probables est sûrement la régulation spatiotemporelle de la signalisation de TLR7 et de TLR9. En effet, des études utilisant du CpGA ont permis de montrer que ce dernier était localisé dans une longue période dans les endosomes précoces là où le complexe MyD88-IRF7 se localise préférentiellement, en opposition aux lysosomes (Honda *et al.*, 2005). Ainsi, la rétention des ligands dans des endosomes précoces des pDC permet la régulation spatiotemporelle de la signalisation de TLR7 et TLR9 induite par la voie MyD88-IRF7. Les pDC semblent pouvoir retenir les ligands dans les endosomes possédant TLR ce qui induit un signal prolongé et permet la phosphorylation *de novo* IRF7 synthétisé et donc l'activation d'un rétrocontrôle positif afin d'induire un signal robuste d'IFN-I.

Il a récemment été montré que l'activation de la voie de signalisation de PI3K est essentielle à la translocation nucléaire de IRF7 (Guiducci *et al.*, 2008). Ainsi, PI3K va activer AKT. La kinase I S6 (S6K1) phosphorylée par mTORC1 ou mTOR directement interagit avec MyD88 ce qui promeut son interaction avec TLR7/9 et IRF7 afin de phosphoryler ce dernier pour qu'il initie la transcription des gènes qui code pour l'IFN-I. D'autre part, la sous-unité p85 de PI3K semble interagir directement avec MyD88 (Gelman *et al.*, 2006).

- IRF2 et IRF4

Il a été montré que IRF2 peut antagoniser la formation d'ISGF3 induit par l'IFN-I. Mais IRF2 peut aussi jouer le rôle d'activateur transcriptionnel de certains gènes sur les séquences ISRE. Des études ont aussi révélées que IRF4 peut former un complexe avec MyD88 et régule de façon négative la voie de signalisation (Negishi *et al.*, 2005). IRF4 réside principalement dans le noyau, mais une fraction significative réside dans le cytoplasme où il peut colocaliser avec MyD88. Il se fixe sur la région centrale de MyD88, comme le fait IRF5, ce qui indique qu'IRF4 peut entrer en compétition avec IRF5 mais pas avec IRF7. La déficience en IRF4 induit une surproduction de cytokines inflammatoires et d'IFN-I par les pDC après une stimulation par les TLR7/9. D'autre part, il a été montré que l'ARNm d'IRF4 était produit après une activation des TLR. IRF4 effectue donc un rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation de TLR (Negishi *et al.*, 2005).

- IRF5

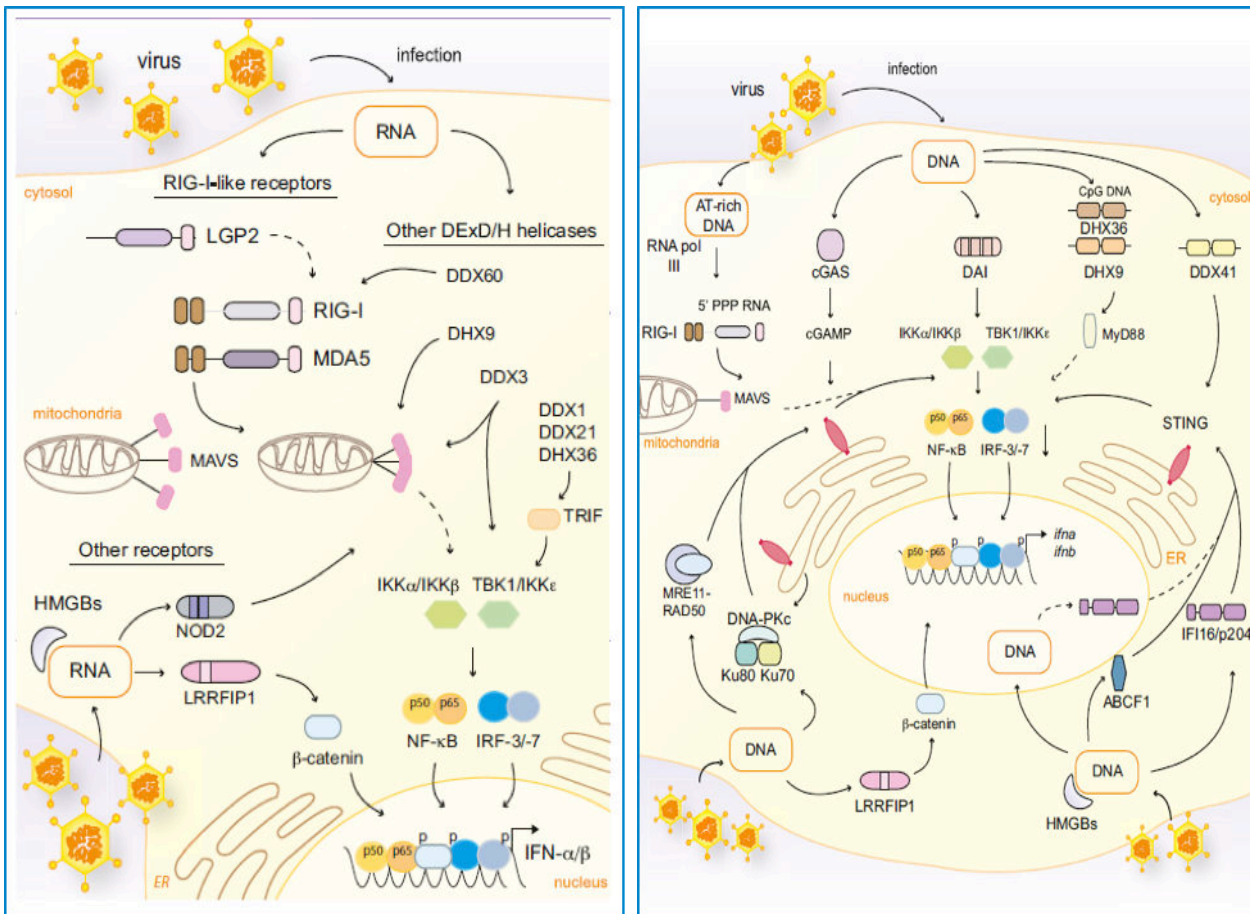
IRF5 peut interagir directement avec MyD88 et TRAF6. IRF5 est indispensable pour l'induction de cytokines pro-inflammatoires et l'IFN-I pour tous les TLR (Takaoka *et al.*, 2005).

Contrairement à IRF7, qui se fixe au DD de MyD88, IRF5 interagit avec la région centrale et une partie du domaine de TIR de MyD88 (Negishi *et al.*, 2005). L'activation de la voie de signalisation de MyD88 par la fixation d'un ligand sur son TLR induit la dimérisation et la translocation d'IRF5 dans le noyau. IRF5 a une fonction cruciale dans la signalisation de TLR et dans l'induction des gènes des cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-6 et IL-12p40) (Takaoka *et al.*, 2005). Après l'activation des TLR, IRF5 se fixe sur les sites ISRE dans le promoteur du gène qui code pour IL-12p40. Cependant, IRF5 n'est pas indispensable à l'activation des gènes dépendants de NF- $\kappa$ B ni à ceux de l'IFN-I. IRF5 est présent dans les pDC sous la forme de 4 isomères dans des proportions différentes. IRF5 a une faible activité stimulatrice d'IFN-I, mais il a un rôle important dans l'immunité antivirale notamment en participant à la transcription d'IFN $\beta$  après une stimulation TLR9. IRF5 forme des homo- ou hétérodimères avec différents IRF, notamment IRF3 et IRF7. A l'inverse d'IRF3 et d'IRF7, IRF5 peut être détecté dans le noyau de cellules non infectées, ce qui pourrait résulter en la présence de deux séquences NLS (Nuclear Localization Sequences), éléments indispensables à la translocation nucléaire induite par les virus, et une séquence NES (Nuclear Export Sequence) qui est responsable de la localisation cytoplasmique d'IRF5 dans les cellules non infectées. De plus, IRF5 présente un polymorphisme complexe impliqué dans de nombreuses maladies auto-immunes.

- IRF8

IRF8 est un autre membre de la famille d'IRF spécifique des cellules immunitaires et est homologue à IRF4. Il a été montré qu'IRF8 avait un rôle dans la voie de signalisation TLR9-MyD88. En effet, une déficience en IRF8 induit une déficience dans la production de cytokines pro-inflammatoires mais aussi une incapacité à activer NF- $\kappa$ B après une stimulation par CpG, ce qui suggère qu'IRF8 agit en amont de NF- $\kappa$ B. IRF8 ne se fixe pas à MyD88 mais interagit avec TRAF6, ce qui indique qu'IRF8 est actif dans le cytoplasme. Dans le noyau, IRF8 est nécessaire à l'expression des gènes codant pour IL-12p40 après une stimulation par un PAMP et pour l'induction des gènes codant pour l'IFN-I induit par des virus et des ligands de TLR. De plus, IRF8 joue un rôle significatif dans l'amplification de la deuxième phase de la transcription de l'IFN-I en prolongeant la fixation des éléments de transcription sur les promoteurs de gènes codant pour l'IFN-I (Tailor *et al.*, 2007). La participation d'IRF8 dans la voie de signalisation de MyD88 ajoute à la diversité de réponses en aval des TLR ce qui permet une réponse spécifique au type cellulaire.

## I. A. 2. Les voies cytoplasmiques



**Figure 4 : La voie d'activation intracellulaire autre que TLR dans les pDC.** Les ARN cytosoliques peuvent être reconnus par les RLR et les NLR mais aussi par les hélicases DExD/H-box. D'autre part les ADN cytosoliques peuvent être reconnus par les ALR et STING. Cette reconnaissance permet d'activer la voie des facteurs de transcription qui induisent la réponse IFN et NF-κB. *Modifié à partir de (Goubau et al., 2013)*

### I. A. 2. i. La voie de la famille des Rétinoïque Acid-Inducible gene I (RIG-I)-Like Receptors (RLR)

Il a été montré que quasiment toutes les cellules nucléées sont capables de produire de l'IFN après une infection virale ou en réponse à de l'ADN double brin dans le cytoplasme, même en absence de TLR et leurs adaptateurs, ce qui suggère qu'il existe un système de senseurs indépendants qui peut détecter les acides nucléiques dans le cytoplasme. La voie cytoplasmique de l'activation d'IRF3 et IRF7 par la voie TBK1, qui va induire l'induction des gènes de l'IFN-I, est nécessairement initiée par la reconnaissance intracellulaire des PAMP. Un des PAMP les plus caractérisés est l'ARN double brin qui est produit par la plupart des virus lors de la réplication virale. Cette voie d'induction de gènes de l'IFN de type I est initiée par l'activation de PRR cytosoliques (Yoneyama and Fujita, 2004).

Un groupe de protéines connues sous le nom des récepteurs de type RIG-I a par la suite été identifié comme jouant un rôle important dans la reconnaissance des pathogènes cytoplasmiques et dans la réponse antivirale (Yoneyama *et al.* 2004; Yoneyama *et al.* 2005). Ces senseurs sont capables de reconnaître les ARN viraux libérés par les virus au moment de l'infection ou produits au cours de la réplication virale.

Ce groupe RLR comprend trois membres: RIG-I, MDA5 (Melanoma-differentiation-associated gene) et LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2) (Stetson and Medzhitov, 2006). Les RLR appartiennent à la famille des hélicases DExD/H-box et possèdent des domaines hélicases à ARN (RNA-helicase domain) avec une activité catalytique qui permet de débobiner l'ARN double brin. De plus, RIG-I et MDA5 présentent une extrémité N-terminale qui possède deux domaines adjacents de recrutement aux caspases (CARD = caspase-recruitment domaine). Par contre, LGP2 ne possède pas de domaine hélicase, ce qui laisse penser qu'il régule plutôt de façon négative les voies de signalisation RIG-I et MDA5 en entrant en compétition avec ces deux molécules. L'interaction du RNA-helicase domaine de RIG-I et de MDA5 avec leur ligand induit des changements conformationnels, ce qui induit en aval, une cascade de signalisation menant à l'activation d'IRF3, d'IRF7 et de NF- $\kappa$ B.

L'agoniste de RIG-I a été identifié comme étant un ARN 5'-triphosphate (PPP), spécifique des séquences d'ARN viraux. En effet, les ARN du soi possèdent initialement des 5'-PPP qui vont soit être masqués par un 7-méthyl-guanosine cap soit être clivés. RIG-I reconnaît aussi bien des ARN double brin courts (25 bases) ou longs (>200 bases) avec des groupes en 3' ou 5' monophosphates ou 5' hydroxyles. RIG-I joue un rôle important à l'activation d'IRF3 et de NF- $\kappa$ B et pour l'induction des gènes de l'IFN-I en réponse à des virus à ARN simple brin négatif comme Newcastle disease virus (NDV), Vesicular stomatitis virus (VSV), Sendai virus et Influenza mais aussi les virus à ARN simple brin positif comme le japonais encephalitis virus (JEV) et hepatitis C virus (HCV) (Kato *et al.*, 2006; Kawai *et al.*, 2005).

MDA5 reconnaît aussi les ARN double brin mais ses agonistes sont moins bien connus. MDA5 aurait une meilleure réponse pour les longs ARN (0.5 à 7 kb). Il peut par exemple reconnaître les longs ARN double brin de l'encephalomyocarditis Virus (EMCV).

RIG-I et MDA5 coopèrent afin d'assurer une réponse antivirale efficace contre tous types de virus à ARN. Ces récepteurs sont aussi capables de reconnaître les ARN synthétiques double brin poly(I :C) et poly(A :U) mais aussi l'ARN 5'-triphosphate artificiel. De plus, RIG-I et MDA5 peuvent être activés par les ARN du soi qui ont été clivés par les RNase L (Malathi *et al.*, 2007). RIG-I et MDA5 peuvent discriminer le soi du non-soi en reconnaissant une modification post-transcriptionnelle déjà détaillée pour les TLR, la 2'-O-méthylation en 5' uniquement présente sur les ARNm du soi.

La reconnaissance de l'ARN viral par RIG-I et MDA5 est ensuite connectée en aval à des voies de signalisation des gènes d'activation grâce à une molécule adaptatrice. Cette molécule est appelée IPS-1 (*IFN $\beta$ -promoter stimulator 1*) (Kawai *et al.*, 2005), CARDIF (*CARD adaptor inducing IFN $\beta$* ) (Meylan *et al.*, 2005), VISA (*virus-induced signalling adaptor*) (Xu *et al.*, 2005) ou plus généralement MAVS (*mitochondrial antiviral signalling protein*) (Xu *et al.*, 2005). Cette protéine possède deux domaines : un domaine CARD-Like en N-terminal, qui s'associe directement au domaine CARD de RIG-I et MDA5 ; et un domaine effecteur en C-terminal qui va recruter les protéines signalétiques comme la protéine adaptatrice FADD (*FAS-associated via death domain*), la protéine kinase RIP1 (*receptor-interacting protein 1*) et TRAF6. FADD, RIP1 et TRAF6 sont impliqués dans l'activation de NF- $\kappa$ B et par conséquent sont aussi impliqués dans l'expression des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires. MAVS recrute TBK1, TRAF3 et l'inhibiteur de la kinase NF- $\kappa$ B (IKK $\epsilon$ ) pour phosphoryler IRF3 et IRF7. IRF3 et 7 sont alors transloqués dans le noyau et induisent la production d'IFN-I (Oganesyan *et al.*, 2006).

D'autres membres de la superfamille DExD/H-box participent à la reconnaissance des acides nucléiques dérivés de pathogènes. On peut, par exemple, citer DDX3 (qui se lie à l'ARN viral), DDX1, DDX21 ou DHX36 (qui se lie au poly(I :C)), DDX60 (qui se lie à l'ARN simple et double brin et à l'ADN), DHX9 et DHX36 (qui se lie au CpG-A et CpGB) et DDX41 (qui se lie à l'ADN double brin). Par ailleurs, DHX9 et DHX36, qui utilisent aussi la voie de signalisation de MyD88 et donc la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B et IRF7, sont spécifiques aux pDC (Kim *et al.*, 2010).

Même si les pDC utilisent préférentiellement TLR pour la détection des virus, la voie des RLR peut avoir une importance majeure dans la réponse immunitaire dans le cas de virus qui contournent la voie endosomale en fusionnant directement avec la membrane, comme les paramyxovirus (Rodriguez and Horvath, 2014). Les RLR sont exprimés à de faibles concentrations dans les cellules non stimulées mais leur concentration est largement augmentée après stimulation. Une étude récente montre en effet que les pDC reconnaissent majoritairement le virus de la fièvre jaune (*yellow fever virus – YFV*) par RIG-I lors de l'infection par des virions libres, par opposition à la transmission par d'autres cellules infectées (Bruni *et al.*, 2015).

#### I. A. 2. ii. La voie de la famille des NOD-Like Receptors (NLR)

Les NLR sont une famille de récepteurs cytoplasmiques qui a diverses fonctions dans le système immunitaire et qui est aussi présente dans les pDC (Yu *et al.*, 2011). Seuls quelques membres de la famille des NLR peuvent fixer directement les PAMP, alors que les autres ont plutôt un rôle de molécules adaptatrices.

Les NOD (nucleotide-binding oligomerization domaine) reconnaissent des PAMP bactériens et sont impliqués dans l'activation de NF- $\kappa$ B et des caspases, mais aucun lien n'a encore été établi avec les IRF (Strober *et al.*, 2006). Un rapport plus récent montre que le NOD2 peut être impliqué dans la production de l'IFN-I en réponse à une infection virale après reconnaissance de l'ARN simple brin (Sabbah *et al.*, 2009). La voie de signalisation proposée implique IPS-1 et par conséquent l'activation d'IRF3. La reconnaissance des ligands *via* les domaines LRR active les protéines NOD qui recrutent ensuite la kinase à sérine-thréonine RICK grâce à une interaction CARD-CARD (Kobayashi *et al.*, 2002). En plus de l'activation du NF- $\kappa$ B, qui passe par la polyubiquitination du complexe NEMO/IKK $\gamma$ , la signalisation de NOD conduit à l'activation de la voie des MAPK bien que le mécanisme précis reste inconnu (Strober *et al.*, 2006).

#### I. A. 2. iii. La voie de la famille des AIM-2-Like Receptors (ALR)

Les ALR sont un nouveau groupe de PRR spécifique des acides nucléiques qui comprend deux membres de la famille PYHIN (pyrin and HIN domain-containing protein family) : le absent in melanoma 2 (AIM2) et l'IFN $\gamma$ -inducible protein 16 (IFI16) (Hornung *et al.*, 2009). AIM2 est capable de reconnaître l'ADN double brin cytoplasmique et d'induire la formation d'inflammasome, ce qui va activer la caspase 1. Afin d'induire la voie de l'IFN-I, IFI16 interagit avec STING, TBK1 et IRF3. IFI16 joue aussi un rôle dans la reconnaissance de l'infection virale dans le noyau, résultant en l'activation de l'inflammasome.

Aucune étude ne prouve la présence et le rôle des ALR dans les pDC. Cependant, des études ont montré qu'AIM2 n'était pas indispensable à la production d'IL-18 dans des monocytes stimulées avec HCV (Chattergoon *et al.*, 2014) ni à la production d'IFN $\beta$  par les macrophages (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2010), même si la production d'IFN $\gamma$  par les NK en réponse à MCMV dépendait en grande partie de AIM2 (Rathinam *et al.*, 2010).

#### I. A. 2. iv. La voie du Stimulator of Interferon Genes (STING)

STING (aussi connu sous le nom de TMEM173, MPYS, MITA et ERIS) est connu pour être une protéine adaptatrice située en aval d'un très grand nombre de PRR. Il a récemment été montré que STING pouvait avoir un rôle important dans les réponses immunitaires à l'encontre de pathogènes bactériens et viraux. STING répond à la présence cytoplasmique d'ADN simple brin et aux dinucléotides cycliques en se relocalisant dans des foyers discrets dans le cytoplasme. Cette relocalisation est associée au recrutement et à l'activation de la kinase TBK1, qui elle-même phosphoryle IRF3, requis pour l'induction de l'expression du gène *IFNB*. Les dinucléotides

cycliques sont des molécules signalétiques de type second messagers produites par diverses bactéries. Ce sont deux ribonucléotides qui se circularisent par des liaisons 5' à 3' phosphodiester. Il existe des molécules cycliques di-GMP (c-di-GMP), des molécules cycliques di-AMP (c-di-AMP) et des hybrides cycliques di-AMP-GMP (cGAMP). Ces dinucléotides sont détectés dans le cytoplasme des cellules de mammifères par une interaction directe sur STING, ce qui active la voie TBK1-IRF3 et donc la voie de signalisation de l'IFN-I (Burdette *et al.*, 2011) mais aussi la voie IKK-NF- $\kappa$ B. Par ailleurs, la protéine cGAMP-synthetase (cGAS) est un senseur d'ADN cytosolique qui permet la synthèse endogène de 2'3'-cGAMP (Sun *et al.*, 2013), lequel est unique et différentiable de tous les autres nucléotides cycliques connus.

Avant la stimulation, STING est déjà un dimère symétrique sous la forme d'un papillon avec un large sillon (Shu *et al.*, 2012). Chaque dimère de STING est capable d'interagir avec une molécule c-GAMP au niveau du sillon ; comme c-GAMP est aussi un dimère symétrique, il épouse parfaitement la forme de STING lors de sa fixation (Burdette and Vance, 2013). Cette fixation va induire un changement conformationnel du complexe qui va lui permettre de s'associer aux autres molécules de la voie de signalisation correspondante. En plus d'interagir avec TBK1 et IRF3, STING peut interagir avec TRAF2 et TRAF3 mais aussi avec STAT6 qui pourra alors phosphoryler TBK1 (Chen *et al.*, 2011). Cette dernière voie va plutôt induire les chimiokines CCL2 et CCL20. Li *et al.*, ont montré en 2013 que cGAS était le senseur principal de l'ADN cytoplasmique dans les pDC (Li *et al.*, 2013).

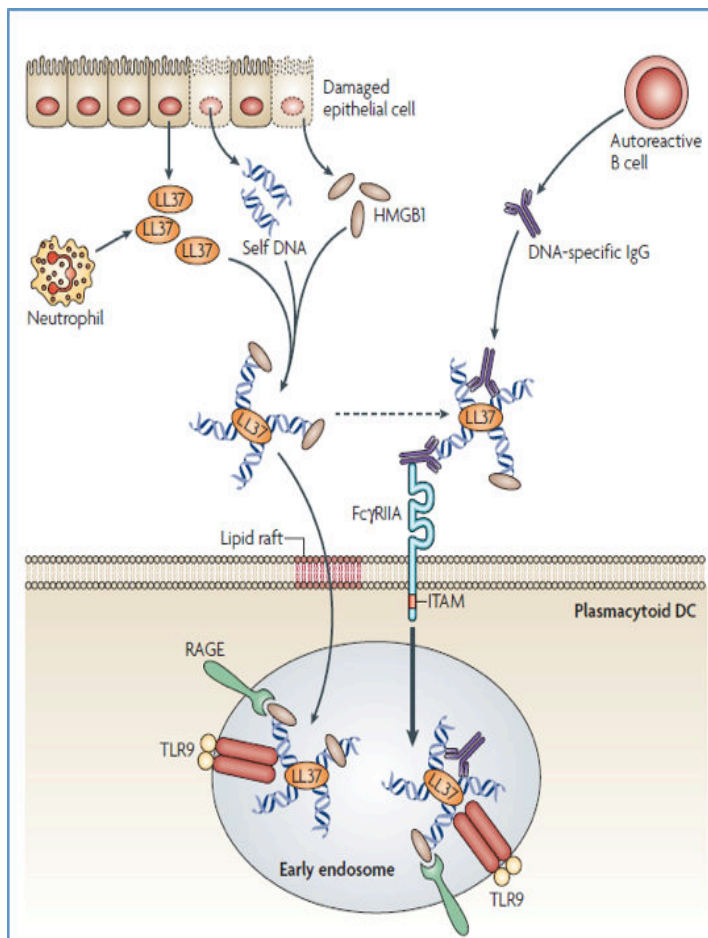
### I. A. 3. La voie du récepteur RAGE

L'inflammation n'est pas toujours synonyme d'infection et peut être déclenchée par d'autres signaux regroupés sous le terme de « signaux de danger » (DAMP : Danger Associated Molecular Pattern), aussi connus sous le nom d'alarmines (Bianchi, 2007). Les alarmines sont caractérisées par un relargage rapide après une mort cellulaire non programmée (nécrose), mais pas par des cellules en apoptose. Elles peuvent aussi être relarguées par des cellules immunitaires vivantes en réponse à un stimulus inflammatoire, comme la détection des PAMP, et peuvent engendrer les réponses immunitaires adaptatives en activant leur récepteur spécifique. Enfin, les alarmines peuvent reconstituer les tissus détruits grâce aux effets secondaires de l'inflammation.

Une des molécules qui respecte le plus la définition des DAMP est la protéine HMGB1 (High-mobility group box 1). HMGB1 est une protéine nucléaire qui se fixe aux nucléosomes et tord l'ADN. Il est présent dans toutes les cellules dans des concentrations variables. Cependant, les cellules cytolytiques, comme les cellules NK, provoquent le relargage de HMGB1 de leurs cellules cibles. De plus, HMGB1 a une activité chimiotractante pour les cellules immunitaires et

endothéliales, une activité pro-angiogénique, induit la maturation des pDC et mDC, mais aussi recrute des cellules souches pour promouvoir leur prolifération. HMGB1 est donc impliqué dans les inflammations aiguës et chroniques, comme dans les sepsis et le lupus érythémateux mais aussi dans les infections virales comme le SRAS, les hépatites virales, la grippe ou encore le VIH (Tian et al., 2007).

Toutes les activités de HMGB1 passent par leur récepteur, la protéine membranaire RAGE qui appartient à la superfamille des immunoglobulines et est exprimée par les cellules hématopoïétiques, dont les pDC. Il a par ailleurs été montré que le complexe HMGB1/RAGE est essentiel dans l'activation de la voie de TLR9 en réponse à des ODN (Gougeon et al., 2012). HMGB1 peut donc se fixer à l'ADN, des acides nucléiques du soi ou des ODN par exemple, et l'interaction de ce complexe avec son récepteur RAGE pourrait induire la maturation et la sécrétion d'IFN de type I par les pDC (Dumitriu et al., 2005), après entrée de l'ADN par endocytose. La reconnaissance des acides nucléiques par les TLR endosomaux peut ainsi être améliorée par la présence de protéines accessoires comme les protéines de la famille de HMGB. En effet, HMGB1 peut se fixer à l'ARN et l'ADN immunogène ce qui contribue à l'activation des TLR (Yanai et al., 2009).



**Figure 5 : La reconnaissance de l'ADN du soi.** Le peptide antimicrobien LL37 est sécrété par les cellules épithéliales endommagées. Il peut se fixer à de l'ADN du soi provenant de cellules mortes et le délivre aux endosomes des pDC. D'autre part, les cellules en apoptose peuvent aussi relarguer HMGB1 qui se fixe aux agrégats de LL37-ADN du soi et promeut l'association avec TLR9 en se fixant à son récepteur RAGE mais aussi en se fixant au récepteur de faible affinité, les FcγRIIA. Modifié à partir de (Gilliet et al., 2008)



## **I. B. LES INTERFÉRONS DE TYPE I**

### I. B. I. La famille des interférons des type I

#### I. B. I. i. La découverte des interférons

Les interférons (IFN) appartiennent à la superfamille des cytokines de classe II. Ce sont l'une des premières cytokines découvertes. En effet, il y a plus de 50 ans, une expérience a montré qu'une substance sécrétée par les cellules en présence de virus, un virus de grippe inactivé, était capable de bloquer la réplication de ce dernier (Isaacs and Lindenmann, 1957). Cette substance, alors nommée interféron, est décrite comme ayant le rôle principal dans l'interférence virale. Les interférons permettent de protéger, par des effets autocrines et paracrines, les cellules infectées en leur conférant une résistance rapide et non spécifique ainsi qu'aux cellules avoisinantes. Les gènes codant pour l'IFN sont multiples, ce qui n'a pas empêché le séquençage de l'IFN $\beta$  et sa production dans un modèle d'*E. Coli* (Nagata et al., 1980).

Il existe à l'heure actuelle trois grandes familles d'IFN (type I, II et III), qui sont classées en fonction de leur localisation chromosomique, de leurs séquences nucléotidiques et de leurs récepteurs membranaires spécifiques.

#### I. B. I. ii. Les différents types d'interférons de type I

Les IFN de type I (IFN-I) connus sont actuellement au nombre de huit, toutes espèces confondues (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\epsilon$ , IFN $\omega$ , IFN $\tau$ , IFN $\kappa$ , IFN $\delta$ , IFN $\zeta$ ). Tous les mammifères possèdent au moins l'IFN $\alpha$  et l'IFN $\beta$ . Chez l'homme, l'IFN $\alpha$  et l'IFN $\beta$  sont les deux les plus présents, et IFN $\omega$ , IFN $\kappa$ , IFN $\epsilon$  ont été décrits mais sont présents en faible quantité (Pestka et al., 2004). Certains de ces IFN-I sont codés par un ensemble de gènes, comme par exemple l'IFN $\alpha$  (Woelk et al., 2007). Au delà de leurs propriétés antivirales, les IFN-I possèdent également de fortes propriétés antiprolifératives, ils interagissent avec un grand nombre de cellules immunitaires et jouent aussi un rôle dans l'embryogenèse et dans l'inhibition de l'angiogenèse. Les IFN-I signalisent à travers leur récepteur IFNAR afin d'engendrer un grand nombre de réponses immunitaires.

##### I. B. I. ii. a. L'interféron $\alpha$

Les interférons  $\alpha$  possèdent un grand nombre de sous-types. Chez l'homme, 14 gènes codent pour 13 protéines isoformes (Woelk et al., 2007). Tous ces gènes ont la caractéristique de ne pas

posséder d'intron et sont tous regroupés sur le chromosome 9, sur la région 9p22 (Genin *et al.*, 2009). Tous ces gènes codent pour des protéines de 189 acides aminés (sauf pour l'IFN $\alpha$ 2, 188 acides aminés), dont les séquences sont conservées à la hauteur de 75 et 99% entre les sous-types. Après excision du peptide signal, les protéines matures possèdent 166 acides aminés (sauf pour l'IFN $\alpha$ 2, 165 acides aminés). Toutes les modifications post-transcriptionnelles, notamment la glycosylation, ne sont pas systématiques et sont présentes uniquement sur les sous-types  $\alpha$ 14 et  $\alpha$ 2. Bien qu'il y ait une forte homologie entre les différents sous-types, il a été rapidement montré que les propriétés antivirales et antiprolifératives étaient très variables d'un sous-type à l'autre (Evinger *et al.*, 1981; Evinger and Pestka, 1981). La réponse IFN $\alpha$  est donc très complexe. Cette complexité fonctionnelle doit encore être explorée en grande partie et pourrait expliquer l'importance du grand nombre de sous-types d'IFN $\alpha$  observés chez les mammifères.

Peu d'études utilisant des modèles d'infections virales ont évalué les activités antivirales des différents sous-types d'IFN $\alpha$ . Cependant, il a été montré que le type cellulaire et le type de virus jouaient un rôle sur l'expression et l'action des différents sous-types d'IFN $\alpha$  (Gibbert *et al.*, 2013). Les pDC peuvent produire de grandes quantités de tous les types d'IFN $\alpha$ , à l'exception de IFN $\alpha$ 6 et IFN $\alpha$ 8, produits en faible quantité, et IFN $\alpha$ 7 qui n'est pas induit (Hillyer *et al.*, 2012). L'IFN $\alpha$ 5 est le sous-type le plus produit par le foie et induit une forte expression d'OAS dans les cellules hépatiques, probablement dû à une forte activation de STAT1 et TYK2 (Tyrosine kinase) par rapport à IFN $\alpha$ 2. Par exemple, IFN $\alpha$ 8 est le sous-type le plus efficace contre la réplication HCV, alors que IFN $\alpha$ 1 est le moins efficace. Les IFN $\alpha$ 2, 6, 7, 8, 10 et 14 sont très efficaces à induire des protéines dépendantes de l'IFN possédant des répétitions tétratricopeptides de type I (IFIT1), mais aussi par les cytokines telles que CXCL10, CXCL11, ISG15 et CCL8 (Gibbert *et al.*, 2013). D'autre part, les IFN $\alpha$ 1 and IFN $\alpha$ 11 sont spécifiquement requis pour une réponse optimale des cellules NK. Les effets variables des différents sous-types d'IFN $\alpha$  sur des types cellulaires spécifiques sont probablement liés à l'activation de récepteurs alternatifs. En effet, il a été montré que l'IFN $\alpha$  induit des voies de signalisation différentes à travers le récepteur complémentaire de type 2 (CR2/CD21) présent sur les lymphocytes B (Asokan *et al.*, 2006).

Le maintien du nombre élevé de sous-types d'IFN $\alpha$  à travers l'histoire est probablement lié à une pression de sélection. En effet, cette diversité permet la mise en place d'un arsenal de réponses adaptées contre les différents virus, et assurant l'induction des ISG les plus efficaces. Cependant, jusqu'à présent aucune fonction précise n'a été attribuée à un sous-type précis ainsi la redondance des sous-types d'IFN $\alpha$  doit être mieux caractérisée.

### I. B. I. ii. b. L'interféron $\beta$

Cet interféron est représenté par un seul gène, *IFNB*, sans intron, codant pour une protéine mature de 166 acides aminés. Le gène de l'IFN $\beta$  est toujours localisé à proximité des gènes de l'IFN $\alpha$ . L'IFN $\beta$  partage environ 35% d'homologie avec les différents IFN $\alpha$  et présente un seul site de N-glycosylation, qui participe à la solubilité de la protéine et non à son activité (Fujisawa *et al.*, 1978).

### I. B. I. ii. c. Les autres sous-types d'interférons de type I

D'autres IFN de type I ont également été décrits chez l'homme (IFN $\epsilon$ , IFN $\omega$ , IFN $\kappa$ ). La majorité possède des activités antivirales mais les différences fonctionnelles peuvent être importantes d'un sous-type à l'autre. L'IFN le plus décrit, après l'IFN $\alpha$  et l'IFN $\beta$ , est l'IFN $\omega$ , présent chez tous les mammifères. Il possède des fonctions antivirales et antiprolifératives que l'IFN $\alpha/\beta$ . L'IFN $\kappa$  est produit majoritairement par les kératinocytes humains (LaFleur *et al.*, 2001) et a un rôle dans l'immunorégulation et dans l'immunité de la peau (Nardelli *et al.*, 2002). D'autres IFN, comme l'IFN $\epsilon$ , jouent un rôle dans l'embryogenèse et le développement (Hardy *et al.*, 2004).

## I. B. 2. Production et mode d'action des interférons de type I

### I. B. 2. i Généralités sur le mode d'action des IFN-I

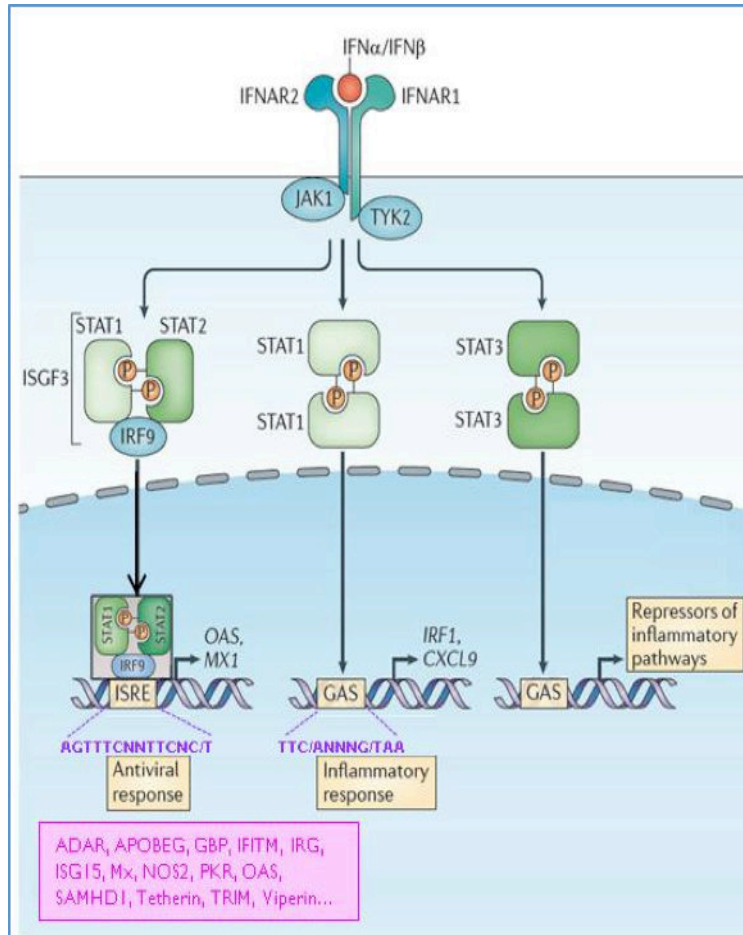
Les IFN de type I sont des polypeptides qui sont sécrétés par les cellules infectées et qui ont trois fonctions principales. Tout d'abord, ils induisent un état intrinsèque antimicrobien dans la cellule infectée et dans les cellules voisines afin de limiter la diffusion des agents infectieux et particulièrement des pathogènes. Dans un second temps, les IFN-I modulent les réponses immunitaires innées de façon à promouvoir la présentation d'antigène et les fonctions des cellules NK tout en modulant les voies de signalisation pro-inflammatoires et la production de cytokines. Finalement, ils activent le système immunitaire adaptatif, en promouvant le développement de la réponse et la mémoire immunologique des lymphocytes T et B aux antigènes spécifiques de haute affinité. Les IFN-I sont protecteurs dans les infections virales aiguës mais peuvent avoir des rôles aussi bien protecteurs que délétères dans les infections chroniques et les maladies auto-immunes (Trinchieri, 2010). La plupart des cellules produisent de l'IFN $\beta$ , alors que les cellules hématopoïétiques, et plus particulièrement les pDC sont les principales productrices d'IFN $\alpha$ .

L'IFN $\alpha$  et IFN $\beta$  sont les IFN-I les plus abondants. Ces cytokines sont principalement connues pour leur capacité à induire un état antiviral à la fois dans les cellules infectées par un virus mais aussi dans les cellules qui ne sont pas infectées, en activant un programme de transcription de gènes qui vont interférer avec les différentes étapes du cycle de la réplication virale. L'IFN $\alpha/\beta$  a un grand nombre de fonctions qui peuvent influencer les réponses de l'immunité innée et adaptative face aux virus, aux bactéries et autres pathogènes. La résultante de la réponse IFN $\alpha/\beta$  pendant une infection dépend principalement du contexte. En effet, des conditions différentes peuvent altérer où et quand l'IFN $\alpha/\beta$  va être délivré ainsi que la voie de signalisation en aval de l'IFNAR. Cela a pour conséquence l'activation ou la répression des ISG et donc au final, une issue positive ou négative pour l'hôte.

Toutes les cellules du corps sont capables de produire de l'IFN $\alpha/\beta$  en réponse à la stimulation des PRR (que ce soit les TLR, RLR, NLR ou ALR) ou de cGAS, par les PAMP correspondants. Dans la majorité des cas, IRF3 et IRF7 sont les IRF indispensables à la transcription IFN-I. Cependant, les autres IRF (IRF1, IRF5 et IRF8) sont aussi impliqués dans l'induction de l'IFN-I. Généralement, les gènes *IFNB* et *IFNA4* sont induits en premier lieu par IRF3, du fait qu'IRF7 n'est pas constitutivement exprimés dans les cellules (sauf dans les pDC). A la suite de cette production initiale d'IFN-I, IRF7 va être transcrit ce qui va générer une boucle de rétrocontrôle positive, amenant à l'induction de la deuxième vague de transcription des gènes ISG.

#### I. B. 2. ii. Voie de signalisation de l'IFN-I

Tous les sous-types d'IFN $\alpha$  et l'IFN $\beta$  se fixent et signalisent à travers un récepteur hétérodimère transmembranaire appelé IFN $\alpha$  receptor (IFNAR), qui est composé de deux sous-unités, IFNAR1 et IFNAR2 (Novick *et al.*, 1994). Les différents sous-types d'IFN $\alpha$  se fixent avec des affinités proches sur les IFNAR1 ( $\mu$ M) et IFNAR2 (nM). L'affinité des IFN $\alpha$  à leur récepteur est importante pour leur rôle antiprolifératif mais pas pour leur activité antivirale. En effet, les cellules ont besoin de répondre rapidement à de faibles doses d'IFN-I pour se débarrasser des infections. Alors que l'activité antiproliférative, qui est souvent liée à l'apoptose et aux dommages tissulaires, doit être finement contrôlée pour ne pas engendrer des dommages inutiles.



**Figure 6 : La voie de signalisation de l'IFN de type I.** La fixation de l'IFN sur son récepteur IFNAR, composé de deux sous unités (IFNAR1 et 2), active la Janus kinase I (JAK1) et la tyrosine kinase 2 (TYK2). La phosphorylation de ces récepteurs par les kinases induit le recrutement, la phosphorylation et la dimérisation et la translocation nucléaire des STAT, sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère. Le complexe ISGF3, composé de IRF9, STAT1 et STAT2, se fixe aux éléments de réponse aux IFN (ISRE) ou éléments des IRF (IRF-E) afin d'induire les gènes ISG. Les homodimères de STAT se fixent eux sur les séquences GAS.  
 Modifié à partir de (Ivashkiv and Donlin, 2014)

Il a été montré il y a 25 ans, que la fixation de l'IFN sur son récepteur IFNAR induit des changements conformationnels qui permettent la formation d'un complexe stable. Ce complexe permet la phosphorylation *in trans* entre la protéine tyrosine kinase associée au récepteur, la Janus kinase I (JAK1) et TYK2. De plus, JAK1 et TYK2 sont constitutivement associés à la sous unité IFNAR2 et IFNAR1 respectivement. Dans la voie de signalisation de l'IFN $\alpha/\beta$ , l'activation de JAK1 et TYK2 induit la phosphorylation des molécules activatrices STAT1 et STAT2, présentes dans le cytosol, et qui induit la dimérisation, la translocation nucléaire et la fixation de STAT1/STAT2 sur IRF9 pour former le complexe ISGF3 (Levy, 2002). Ce complexe ISGF3 va ensuite se fixer aux séquences ADN correspondantes et plus particulièrement sur les ISRE dont la séquence consensus est TTTCCNNTTTC, ce qui a pour action de transcrire des ISG. De cette façon,

l'IFN $\alpha/\beta$  induit l'expression de centaines d'ISG, qui vont mettre la cellule dans un état antiviral (Ivashkiv and Donlin, 2014).

La réponse cellulaire en aval de l'activation des IFNAR dépend du type cellulaire et du contexte infectieux, ce qui envoie des signaux différents durant la réponse immunitaire. En effet, ces signaux régulent l'expression et les modifications post-traductionnelles des composants issus de la voie de signalisation d'IFNAR et JAK-STAT. D'autre part, les signaux permettent l'expression d'ISG spécifiques et donc la régulation de l'expression des protéines.

Les effets divers des IFN $\alpha/\beta$  peuvent en partie être expliqués par cette diversité de voies de signalisation. En effet, elles induisent la transcription d'un large spectre de gènes en plus de ceux dédiés à la restriction virale. Les gènes impliqués peuvent coder pour des cytokines, des chimiokines, des effecteurs antibactériens et des molécules impliquées dans les processus métaboliques (Ivashkiv and Donlin, 2014). Les protéines ISG empêchent la progression des pathogènes en inhibant leur transcription virale, leur traduction et leur réplication, en dégradant les acides nucléiques viraux et en altérant le métabolisme des lipides cellulaires.

#### I. B. 2. iii. Régulation basale de la voie de signalisation de l'IFN-I

Les composés de la voie de signalisation de l'IFN-I (IFNAR, JAK1, TYK2, STAT1, STAT2 et IRF9) sont largement exprimés et ainsi la plupart des cellules sont capables de répondre à l'IFN-I. Les cellules immunitaires répondent rapidement à de faibles niveaux d'IFN-I, grâce à une boucle autocrine dans laquelle de faibles quantités d'IFN $\beta$  maintiennent un niveau basal de STAT1 et IRF9, qui sont eux-mêmes des ISG. Cette particularité permet aux cellules d'être mobilisées rapidement pour des programmes antimicrobiens. D'autre part, il a été montré que cette production basale d'IFN $\beta$  dans des conditions homéostatiques est régulée par la flore microbienne commensale (Abt *et al.*, 2012) ainsi que par les récepteurs associés aux ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation) qui lient des ligands constitutivement exprimés. En effet, les ITAM activent PYK2 pour amplifier l'activation de JAK dépendante de l'IFN-I (Wang *et al.*, 2008). D'autre part, l'amplitude de la voie de signalisation des IFNAR est contrôlée par des signaux opposés qui limitent l'expression d'IFNAR-JAK-STAT. Ces mécanismes impliquent l'arrêt de la polymérase à ARN de type II (Pol II) sur des gènes qui codent pour des composants de la voie de l'IFN.

#### I. B. 2. iv. Augmentation de la voie de signalisation de l'IFN-I

L'augmentation de la réponse IFN-I passe par l'induction de l'expression de STAT1 et IRF9, Syk (Spleen Tyrosine Kinase) et PYK2. STAT1 et IRF9 sont des ISG et leur expression est régulée

par tous les IFN-I, IFN $\gamma$  et des cytokines qui activent les STATs comme l'IL-6. L'augmentation de STAT1 mène à son interaction avec les IFNAR et son activation par les IFNAR, alors que l'augmentation d'IRF9 mène à la fixation d'ISGF3 aux gènes cibles. Le TNF peut induire de très faibles concentrations d'IFN $\beta$  (au picomolaire) qui sont suffisantes pour augmenter l'expression de STAT1, ce qui permet d'initier la réponse IFN des macrophages pendant les phases précoces de l'infection. A l'inverse, de grandes quantités de STATs et d'IRF9 peuvent assurer l'expression prolongée d'un panel d'ISG sur de longues périodes, même en l'absence de signalisation. La phosphorylation d'une sérine de STAT1, qui augmente son activité transcriptionnelle, est régulée par divers membres de la PKC et de la famille des MAPK. Ainsi STAT1 est régulé par un grand nombre de cytokines et chimiokines qui activent la PKC et MAPK. De façon générale, la voie des IFNAR est augmentée par divers mécanismes induits par différentes familles de récepteurs qui lient des ligands variés.

#### I. B. 2. v. Régulation quantitative de l'IFN-I

L'amplitude de la réponse IFN-I peut être régulée ; mais la nature qualitative de l'IFN est elle aussi régulée. Ceci permet, à partir d'un signal commun, d'engendrer différentes réponses biologiques. En effet, un des mécanismes qui peut expliquer cela est l'activation différentielle des STAT qui ont des gènes cibles et des fonctions biologiques différents. La voie de signalisation de l'IFN $\alpha/\beta$  n'est pas limitée à la voie STAT1/2. En effet, l'IFN $\alpha/\beta$  peut induire une voie de signalisation à travers l'homodimère de STAT1, qui est plus communément associée à la voie de signalisation de l'IFN $\gamma$  qui se fixe à les séquences gamma des promoteurs des gènes (GAS :  $\gamma$ -interferon activated site). L'IFN $\alpha/\beta$  (notamment IFN $\alpha$ 2, 4 et 5) peut aussi induire, dans certains types cellulaires, une voie de signalisation normalement associées à d'autres cytokines, comme STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B et STAT6. L'équilibre entre l'activation des différents STATs par les IFNAR est en partie déterminé par les niveaux relatifs d'expression de STAT. Contrairement à STAT1, l'homodimère STAT3 agit comme un régulateur négatif de la réponse antivirale IFN en inhibant l'expression des gènes pro-inflammatoires. Le dimère STAT3 activé par l'IFN-I se fixe au complexe corépresseur SIN3 transcription regulator A (SIN3A), ce qui supprime l'induction des gènes cibles de STAT3 en augmentant la dé-acétylation de STAT3 et des histones (Murray, 2007).

#### I. B. 2. vi. Signaux d'induction de la production d'IFN de type I

De façon synthétique, il a été montré que l'induction de la transcription des gènes par STAT et ISGF3 était régulée à plusieurs niveaux.

#### I. B. 2. vi. a. L'interaction de STAT avec d'autres facteurs de transcription

Il a largement été montré que les STATs interagissent avec les membres de la famille des IRF. La séquence ADN reconnue par les IRF se superpose avec les ISRE, ainsi les IRF peuvent se fixer sur des séquences que l'on renomme IRF-E et activer beaucoup des gènes cibles des ISGF3. De plus, l'expression d'IRF1, IRF7, IRF8 et IRF9 est induite par les IFN à travers des mécanismes dépendants de STAT, et un grand nombre d'ISG possèdent à la fois des séquences GAS et ISRE ou IRF. Ces observations ont permis d'établir l'activation de certains ISG par les STAT et ISGF3, comme les IRF, qui vont eux-mêmes activer un deuxième groupe d'ISG. Les STAT peuvent s'associer aux IRF pour former des complexes différents d'ISGF3, comme STAT1 qui s'associe directement avec IRF1 et peut ainsi se fixer de façon indirecte à des gènes qui ne possèdent pas des sites GAS. STAT peut aussi interagir avec NF- $\kappa$ B, activé par les PRR, ce qui va permettre une augmentation et l'induction synergique des gènes cibles. De façon concise, on peut aussi citer la coopération de STAT avec d'autres facteurs de transcription comme Promyelocytic leukaemia zinc finger protein (PLZF = ZBTB16) et factor forkhead box protein O3 (FOXO3).

#### I. B. 2. vi. b. Régulation traductionnelle des réponses de l'IFN-I

Même si l'IFN-I est connu pour avoir des puissants effets dans l'inhibition de la traduction protéiques, dans certains types cellulaires, il peut activer cette dernière. En effet, la voie de signalisation PI3K-mTOR et diverses voies de signalisation de la MAPK peuvent aussi être activées en aval des IFNAR. La voie de signalisation PI3K-mTOR promeut la traduction des ISG *via* l'inactivation du suppresseur translationnel eIF4E-binding protein 1 (EIF4EBP-1) et l'activation de la protéine ribosomale S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1 (p70S6), ce qui va activer *in fine* la traduction des facteurs d'initiation, tels que IRF7 et donc induire la production d'IFN.

#### I. B. 2. vii. Mécanisme de régulation de la voie de signalisation d'IFN

La phosphorylation d'une sérine de STAT1, qui mène à son activation, peut être régulée par différents membres de PKC et de la famille des MAPK. Ainsi, l'activité de STAT1 est modulée par un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines.

Les mécanismes qui suppriment les réponses aux IFN-I incluent la diminution de l'expression des IFNAR en surface, l'induction de régulateur négatif (comme les protéines SOCS = suppressor of cytokine signalling et USPI8 = ubiquitin carboxy-terminal hydrolase 18) et l'induction de micro ARN. Les protéines SOCS (SOCS1 et SOCS3 – suppressor of cytokine



signaling) sont en compétition avec les STAT pour la fixation à l'IFNAR et suppriment l'activité JAK, alors que USPI8 délée JAK1 de IFNAR2. Ces protéines inhibitrices sont aussi induites par diverses cytokines qui activent la voie JAK-STAT, par des récepteurs associés aux ITAM et par des cytokines pro-inflammatoires et les PRR qui activent la voie des MAPK.

L'équilibre entre ISGF3 et l'homodimère STAT1 activé peut aussi être régulé par l'inhibiteur de NF- $\kappa$ B, IKK $\epsilon$ . La phosphorylation de STAT1 par IKK $\epsilon$  supprime la formation de l'homodimère STAT1, ce qui facilite la formation de l'ISGF3 et donc augmente la réponse antivirale (Ivashkiv and Donlin, 2014).

L'IFN $\beta$  induit l'expression de divers micro-ARN (miRNA), ce qui va contribuer à un état antiviral en ciblant les transcrits viraux et de l'hôte, ce qui résulte en la diminution de la traduction et augmente la dégradation. La plupart des miRNA qui ciblent les transcrits de STAT1, STAT2 et IFN $\beta$  sont induits par les IFN-I, comme miR-146a, qui peut aussi être induits par les PRR la voie de signalisation des cytokines inflammatoires. Il semble donc que les miRNA induits par l'IFN-I participent au rétrocontrôle négatif. Ainsi les pathogènes peuvent utiliser ces régulateurs négatifs pour échapper aux actions antimicrobiennes des IFN-I.

### I. B. 3. Le rôle des Interferon Stimulated Gene (ISG)

Comme nous l'avons vu précédemment, la sécrétion de l'interféron contre les pathogènes détectés par les cellules peut être amplifiée et se propager aux cellules environnantes non infectées par la voie JAK-STAT et ainsi activer des centaines d'ISG, la plupart desquels codent pour des produits qui ont des effets antiviraux importants principalement sur les étapes du cycle viral, comme la dégradation des acides nucléiques viraux ou l'inhibition de l'expression de gènes viraux. Le mécanisme d'action de la majorité des ISG dont l'IFN a largement été décrit. Nous n'allons pas détailler ici les différentes familles d'ISG très bien détaillées dans la revue par Yan et Chen (Yan and Chen, 2012).

Cependant, nous pouvons citer les plus connus comme :

- La famille des Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide : les APOBEC ont été identifiés comme des protéines inhibitrices des rétrovirus grâce à leur action de déamination des résidus cytosines dans l'ADN complémentaire en formation. Il existe 11 protéines différentes APOBEC.
- La famille de molécule tripartite motif-containing : chez l'homme, il existe au moins 65 membres dans la famille des TRIM. Plusieurs membres de la famille de TRIM ont un rôle dans l'inhibition du cycle viral de VIH-1 ; on peut citer par exemple un rôle inhibiteur dans la

décapsidation du virus lors de son entrée (le plus connu est TRIM5 $\alpha$ ), dans sa transcription, dans son assemblage. Les membres de la famille de TRIM ont aussi un rôle dans la régulation des voies de signalisation en aval des TLR, que ce soit dans son activation ou dans son activation (Review in (Ozato et al., 2008)).

- La molécule Téthérine : Téthérine (=BST2) a déjà été décrit précédemment en tant que ligand de ILT7, le récepteur spécifique des pDC. Hormis son rôle de ligand, BST2 est capable de cibler beaucoup de virus à enveloppe. Téthérine retient les virions à la surface membranaire en insérant l'ancre membranaire glycosylphosphatidylinositol dans l'enveloppe du virion. Les virions retenus vont alors être internalisés par endocytose et donc être dégradés dans les endosomes (Neil et al., 2008).

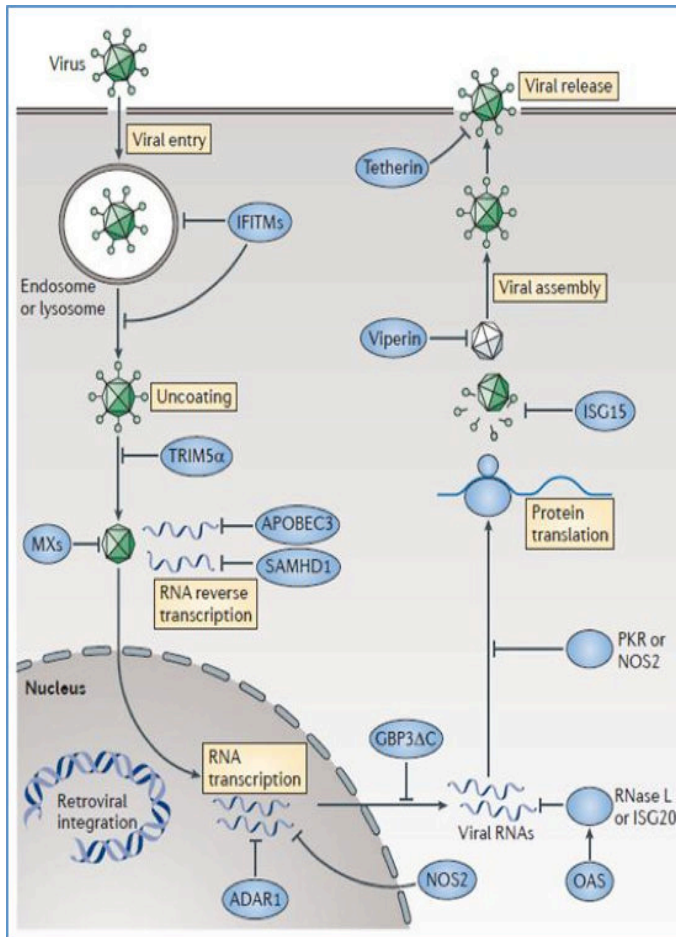
- La molécule SAMHDI : SAMHDI convertis les déoxynucleosides triphosphates (dNTPs) en déoxynucleosides et triphosphates. SAMHDI peut ainsi réguler la quantité de dNTP dans les cellules et donc bloquer la transcription inverse des virus. (Goldstone et al., 2011).

- La famille des Interferons induced transmembrane proteins : Les membres de la famille de IFITM, qui sont au moins au nombre de 5 (IFITM1, IFITM2 IFITM3, IFITM5 et IFITM10), ont une activité antivirale, mais aussi dans l'adhérence cellulaire, la signalisation et l'antiprolifération. Ces protéines sont omniprésentes et régulées par les IFN-I. IFIT est l'un des facteurs de restriction qui agit dans les étapes précoces de la réplication virale (Diamond and Farzan, 2013).

- Myxovirus Resistance A : La Myxovirus Resistance A (MxA) humaine (aussi appelé Mx1) est une GTPase avec de grandes activités antivirales contre les virus à ARN et à ADN. MxA se fixe aux membranes chargées négativement et forme des oligomères sous la forme d'anneau autour des tubes lipidiques des virus. Dans les cellules infectées, MxA se déplace de l'RE vers les structures périnucléaires qui contiennent les nucléoprotéines virales (Dick et al., 2015).

- Le système RNase L / 2'-5'-oligoadenylate synthetase : La famille de OAS contient quatre ISG (OAS1, OAS2, OAS3 et OASL) et sont des enzymes actives qui peuvent générer des 2'-5'-linked oligoadenylates, contrairement à OASL qui est dépourvu de cette fonction mais qui un rôle de régulation positive dans la voie de RIG-I. Ces 2'-5'-linked oligoadenylates sont des seconds messagers qui peuvent activer la RNase L (Choi et al., 2015).

- La kinase IFN inducible double-stranded RNA-dependent : L'une des actions antivirales la plus connue est l'activation de la voie de PKR (codé par EIF2AK2). PKR inhibe ainsi totalement la traduction des protéines virales.



**Figure 7 : Mécanisme intracellulaire utilisant les ISG contre les virus.** Beaucoup de stratégies antivirales sont mises en place par les protéines induites par l'IFN. Les ISG agissent dans toutes les étapes de du cycle de réplication du virus. Les IFITM et les TRIM agissent sur l'entrée et la décapsidation. Mx bloque le transport de la nucléocapside. APOBEC3, SAMHD1, ADAR, NOS, OAS, RNase L, PKR et ISG15 bloque la transcription inverse, la translation protéique et la stimulation de la particule virale. Viperin bloque l'assemblage alors que Téthérine bloque le bourgeonnement. *Modifié à partir de (MacMicking, 2012)*

#### I. B. 4. Les « ISG cellulaires »

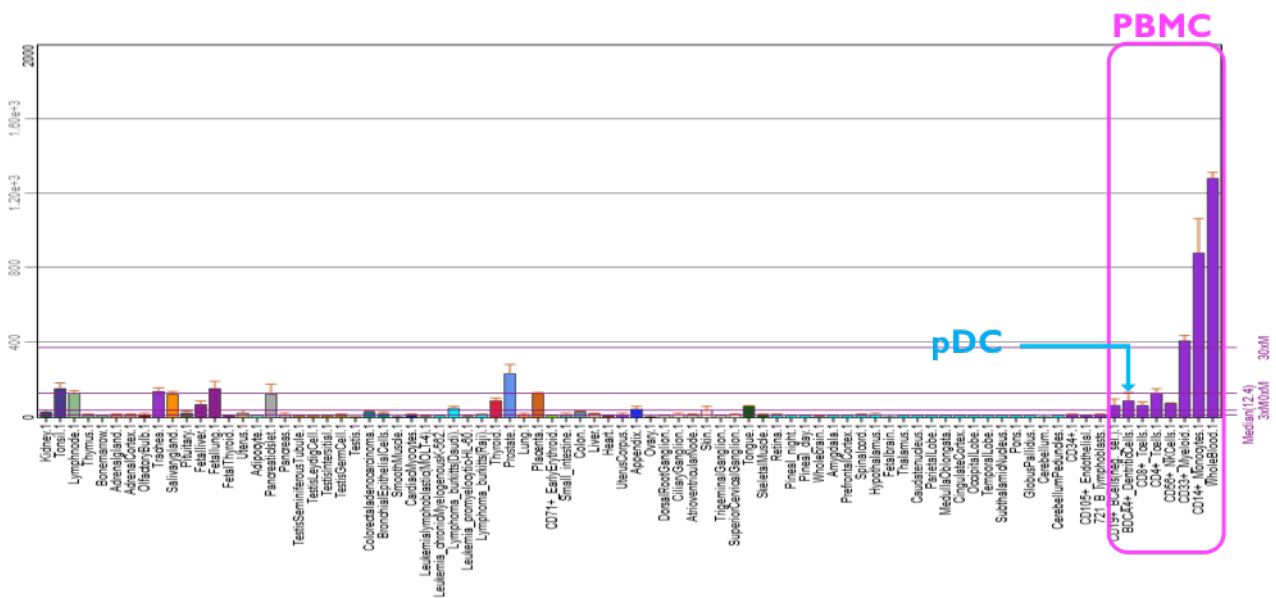
La grande majorité des ISG cible directement le virus. Cependant, il existe une autre catégorie d'ISG qui n'interfère pas directement avec des étapes de la réplication virale : les « ISG cellulaires ». Lorsque tous les ISG décrits précédemment échouent au niveau des différentes étapes de l'inhibition de l'infection, les ISG cellulaires ont pour but de tuer les cellules infectées afin que le virus ne puisse pas se propager. Dans la famille des ISG cellulaires ont compte notamment la superfamille du TNF, composée principalement de Fas/FasL et du ligand pro-apoptotique TNF-Related Apoptosis Induced Ligand (TRAIL) et de son récepteur de mort (DR5) (détaillée dans l'Introduction de l'Annexe).

##### I. B. 4. i. Les cellules qui expriment le ligand pro-apoptotique TNF-Related Apoptosis Induced Ligand (TRAIL)

TRAIL est exprimée, au niveau protéique et messenger (Liabakk and Espevik, 2004) dans de nombreux organes, comme le foie, les poumons, le placenta, les reins, la rate (Wiley *et al.*, 1995). TRAIL est aussi exprimée par des cellules impliquées dans la défense de l'hôte, des cellules de

l'immunité innée ou adaptative, telles que les cellules NK (Sato *et al.*, 2001), les cellules dendritiques (Fanger *et al.*, 1999), les lymphocytes T et B activés (Jeremias *et al.*, 1998), les monocytes/macrophages (Griffith *et al.*, 1999), les pDC (Hardy *et al.*, 2007) ce qui leur confère une activité cytotoxique. TRAIL ciblent spécifiquement des cellules tumorales, sans avoir d'effets toxiques sur les cellules normales. Des études *in vitro* ont montré l'implication de TRAIL dans la mort de cellules cancéreuses du colon par les macrophages (Herbeuval *et al.*, 2003), dans l'apoptose de cellules de mélanomes et de carcinomes ovariens. La forme soluble de TRAIL est quant à elle relarguée dans le surnageant lors de stimulations virales (Han *et al.*, 2002), mais aussi dans le cas de maladies auto-immunes (Wandinger *et al.*, 2003), inflammatoires (Robertson *et al.*, 2002) et lors de cancers (Cretney *et al.*, 2007).

#### I. B. 4. ii. Induction de l'expression de TRAIL



**Figure 8 : Les cellules et les tissus qui expriment TRAIL.** L'ARNm de TRAIL est principalement retrouvé dans les PBMC Réalisé avec BioGPS.org

Les niveaux d'expression de TRAIL sont déterminés par le profil des cytokines pro-inflammatoires. Des cytokines telles qu' $IFN\alpha$ ,  $IFN\beta$  et  $IFN\gamma$  stimulent l'expression de TRAIL (Almasan and Ashkenazi, 2003). Les IFN jouent un rôle essentiel dans la défense de l'hôte, autant en tant que molécule antivirale qu'en tant que molécule anti-tumorale. Les IFN n'étaient pas, au départ, connus pour leur propriété d'inducteurs de la mort cellulaire ; cependant, plusieurs études ont montré que les IFN pouvaient remplir le rôle de cytokines inductrices d'apoptose dans un grand nombre de lignées cellulaires cancéreuses (Chawla-Sarkar *et al.*, 2003). De façon générale, l' $IFN\beta$  est un bien meilleur inducteur de l'apoptose que l' $IFN\alpha$ . Une fois que l'IFN se fixe à son

récepteur IFNAR, la voie des JAK/STAT est activée et le complexe ISGF3 est formé. ISGF3 peut alors se fixer sur les ISRE dans le noyau, dont fait partie les séquences de TRAIL (Zhang *et al.*, 2000). Le promoteur du gène *TRAIL* possède aussi plusieurs autres sites de fixation : IFN $\gamma$ , FOXO, NHF3, GKLf, AP-1, CEBP, NFAT, GATA, GAS, GSPI, GSP2 et GSP4 mais aussi NF- $\kappa$ B (qui est par exemple responsable de l'expression constitutive de TRAIL dans les leucémies induites par le virus HTLV-I (Human T-lymphotropic virus I)) et p53. L'induction transcriptionnelle de TRAIL est l'un des événements les plus précoces dans certains cancers.

En plus des IFN, IL-2, IL-7 et IL-15 induisent l'expression de TRAIL dans les NK et le LPS potentialise la cytotoxicité des macrophages et des monocytes grâce à l'augmentation de l'expression de TRAIL. Le rôle de l'IFN $\gamma$  dans l'induction de l'expression de TRAIL à la surface des NK a aussi été démontré (Takeda *et al.*, 2001). En effet, TRAIL membranaire est l'un des mécanismes effecteurs de la mort des cellules tumorales par les cellules NK et l'induction de TRAIL par l'IFN $\gamma$  est nécessaire dans la prévention de la formation de tumeurs et de métastases expérimentales. TRAIL est aussi présent sur les IFN- $\gamma$ -producing killer dendritic cells (IKDC) ; cette découverte permet d'établir un lien essentiel entre le système immunitaire inné et adaptatif (Chan *et al.*, 2006 ; Taieb *et al.*, 2006). De la même façon, seul les monocytes, les cellules dendritiques et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> stimulés par l'IFN $\gamma$  expriment TRAIL (Halaas *et al.*, 2000). Ainsi, TRAIL joue un rôle central dans l'induction de la cytotoxicité des T et des NK dans les maladies infectieuses et dans les cancers.

De l'ARNm de TRAIL peut être détecté dans les PBMC après l'activation par un anticorps monoclonal anti-CD3 ou de la PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)/ionomycin (Jeremias *et al.*, 1998). L'augmentation de l'expression de TRAIL a été détectée sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dans le sang périphérique après stimulation du TCR (T-cell receptor), en combinaison avec de l'IFN de type I (Kayagaki *et al.*, 1999). L'augmentation de l'expression de TRAIL dépend de la costimulation de l'IFN $\alpha$  ou IFN $\beta$  avec la stimulation de TCR/CD3. Du LPS combiné avec la PHA (phytohemagglutinin) et de l'IL-2 peut aussi induire TRAIL de façon dépendante à l'IFN. D'autres études ont montré que la PHA stimule également la libération de TRAIL par des Jurkat ou des PBMC humaines (Martinez-Lorenzo *et al.*, 1998). Ainsi, l'IFN de type I peut réguler la cytotoxicité par TRAIL des lymphocytes T (Ehrlich *et al.*, 2003). L'expression de TRAIL sur les cellules immunitaires et la stimulation de l'expression de TRAIL par les cytokines pro-inflammatoires et le LPS sont des éléments qui supportent l'hypothèse que TRAIL est un acteur dans le système immunitaire. Les IFN de type I stimulent l'expression de TRAIL et coordonnent les réponses immunitaires multifactorielles contre les pathogènes intracellulaires en créant un état antiviral ; de ce fait on peut affirmer que TRAIL joue un rôle primordial dans la réponse immunitaire contre les

pathogènes. Ainsi les IFN de type I et II possèdent des propriétés anti-tumorales et antivirales dans lesquelles TRAIL pourraient jouer un rôle (Cummins and Badley, 2009; Falschlehner et al., 2009).

#### I. B. 4. iii. Induction de TRAIL par et sur les pDC : TRAIL un ISG ?

Comme détaillé précédemment, TRAIL peut être induit par les IFN de type I et de type II. En 2000, Gong et Almasan ont montré que le complexe ISGF3 formé après la fixation de l'IFN de type I à son récepteur, se lie aux ISRE dans le promoteur de TRAIL et stimule son activité transcriptionnelle (Kirshner et al., 2005; Sato et al., 2001). Pour l'IFN de type II, après liaison à son récepteur, l'homodimère STAT1 se lie aux éléments de réponse GAS ( $\gamma$ -interferon activated site) dans le promoteur de TRAIL. De ce fait, TRAIL peut être considéré comme un ISG puissant afin d'accomplir ses fonctions cytotoxiques lors d'infections virales ou dans des environnements tumoraux.

Par la suite, l'équipe de Joël Plumas a démontré à plusieurs reprises sur l'induction de TRAIL lors d'infections virales et de tumeurs dans leur modèle de lignée cellulaire leucémique, les GEN2.2. En effet, ils ont montré que les GEN2.2 exprimaient TRAIL après 4h de stimulation avec des virus ou des ligands synthétiques et que cette induction était régulée par la boucle autocrine de l'IFN $\alpha/\beta$  (Blum et al., 2006; Chaperot et al., 2006). Par la suite, ils ont démontré que TRAIL pouvait aussi être induit sur les GEN2.2 en l'absence d'IFN de type I, on parle alors d'« ISG précoce ». Les GEN2.2 ne sécrètent pas d'IFN après une stimulation par le ligand synthétique CL097, alors que les niveaux d'IFN produits après une stimulation par la grippe sont élevés. Grâce à cette caractéristique, la boucle autocrine de l'IFN $\alpha/\beta$  peut alors être évitée, et ainsi prouver que les GEN2.2 étaient toujours capables d'exprimer TRAIL après stimulation avec CL097. Cependant, ils ont aussi démontré que les GEN2.2 étaient hautement sensibles à la mort induite par TRAIL, qu'il soit recombinant ou à la surface de cellules NK. En effet, contrairement aux pDC primaires, les GEN2.2, en tant que cellules tumorales possèdent une grande quantité de DR5 à leur surface.

D'autres études ont identifié des inducteurs de la transcription de TRAIL indépendante de la voie des récepteurs à l'IFN. Sur les GEN2.2, il a été montré que l'expression de TRAIL est indépendante des IFN mais dépendait de STAT1 et de l'activation de p38 MAPK induite par l'activation de PI3K, qui est important dans la translocation d'IRF7 (Guiducci et al., 2008). D'autre part, il a montré sur des cellules autres que les pDC, des cellules primaires (human foreskin keratinocytes [HFK]) et tumorales (human colonic adenocarcinoma cells [HT-29]), que seul IRF3 pouvait activer le promoteur de TRAIL en réponse à une infection par SeV (Sendai Virus) (Kirshner et al., 2005). Dans d'autres lignées telles que SK-BR-3, IRF1 est indispensable à la

transcription de TRAIL (Clarke *et al.*, 2004). Plus récemment, il a été montré sur une autre lignée de pDC, les CAL-1, que le facteur de transcription NGFI-A-binding protein 2 (NAB2) induit par PI3K, joue le rôle de co-activateur de TRAIL lors de l'activation de TLR7/9 (Balzarolo *et al.*, 2012). Tous ces résultats permettent ainsi d'affirmer qu'il existe deux voies de signalisation de TRAIL : (i) la voie de signalisation en aval des IFNAR dépendante de la production d'IFN et (2) la voie de signalisation en aval de l'activation des TLR (IRF, PI3K...) indépendante de la production d'IFN. Cependant, il semble clair que les deux voies de signalisation agissent en synergie afin d'exprimer TRAIL de façon optimale. Toutes ces dernières études ont uniquement été effectuées dans des lignées, or les pDC sont des cellules uniques dont la régulation est très spécifique. Pour comprendre la régulation de TRAIL dans les pDC, d'autres études devraient être effectuées.

La notion de cellules dendritiques tueuses a pu être accordées aux pDC, alors appelées IKpDC (IFN-producing killer plasmacytoid dendritic cells), lorsque Hardy *et al.*, ont montré en 2009 que les pDC expriment TRAIL à leur surface après endocytose de virions de HIV-1 (Hardy *et al.*, 2007). Ce résultat a été validé avec d'autres virus, comme HTLV-1. Par ailleurs, l'équipe de Jean-Philippe Herbeuval a montré que TRAIL était présent en très grande quantité dans le cytoplasme de pDC non activées. Ce résultat permet de mieux comprendre comment TRAIL est exprimé si rapidement (moins de 4h) à la surface des pDC après stimulation virale. En effet, ce stock important de TRAIL intracellulaire est relocalisé vers la surface et favorise une réponse rapide des pDC contre les infections virales (Colisson *et al.*, 2010). Cependant, le mécanisme qui permet cette relocalisation reste encore à être étudié.

### I. B. 5. Les autres familles d'interférons

#### I. B. 5. i. Les interférons de type II

La famille de l'IFN de type II est composée par le produit d'un seul gène, l'IFN $\gamma$ , qui est principalement produit par les lymphocytes T et les cellules NK. L'IFN $\gamma$  peut avoir une action sur un large spectre de cellules qui possèdent leur récepteur (IFN $\gamma$ R), qui est faiblement présent de façon ubiquitaire. Ce récepteur est composé par deux sous unités identiques formées par le complexe IFN $\gamma$ R1/IFN $\gamma$ R2, sur lesquelles sont fixées JAK2 et JAK1. L'activation du récepteur va permettre la phosphorylation de l'homodimère STAT1. Ce complexe va ensuite se fixer aux séquences ADN correspondantes et plus particulièrement sur GAS, dont la séquence consensus est TTCNNGAA.

#### I. B. 5. ii. Les interférons de type III

La famille de l'IFN de type III est composée par l'IFN $\lambda$ 1, IFN $\lambda$ 2 et IFN $\lambda$ 3 (aussi connu sous le nom de IL-29, IL-28A et IL-28B respectivement) (Kotenko *et al.*, 2003 ; Paul and Regulier, 2002), qui sont produits par la plupart des cellules et notamment par les pDC (Coccia *et al.*, 2004). Récemment, IFN $\lambda$ 4 a été identifié (Prokunina-Olsson *et al.*, 2013). Tous ces IFN-III présentent les mêmes fonctions que les IFN-I mais avec une activité réduite, du fait que leur récepteur n'est présent que sur les cellules épithéliales de surface (Prokunina-Olsson *et al.*, 2013). L'IFN-III se lie à son récepteur formé par les sous-unités IL-10R $\beta$  et IFN $\lambda$ RI, respectivement associées à TYK2 et JAK1. De la même façon que détaillé précédemment pour les IFN-I, les ISRE vont être activés afin d'induire les ISG correspondants.



## II. LES CELLULES DENDRITIQUES PLASMACYTOÏDES ET LEUR RÔLE DANS L'IMMUNITÉ

### II. A. INTRODUCTION SUR LES CELLULES DENDRITIQUES PLASMACYTOÏDES HUMAINES

#### II. A. I. Découverte des pDC

En 1958, Lennert and Remmele (Lennert and Remmele, 1958) ont identifié un type cellulaire présent dans les ganglions riches en lymphocytes T activés jusqu'alors inconnu. Ces cellules ont tout d'abord été mises dans la catégorie des lymphoblastes. Bien plus tard, il a été montré que ces cellules exprimaient le marqueur membranaire caractéristique des lymphocytes T, le CD4, mais pas l'immunoglobuline spécifique des lymphocytes B. Elles furent alors nommées « cellules T plasmacytoïdes » (Feller *et al.*, 1983). Par la suite, il est apparu qu'elles avaient également un rôle important dans la sécrétion des lymphokines. Cependant, elles ne possédaient pas le récepteur à l'antigène des cellules T, le TCR, ni le marqueur spécifique associé, le CD3, mais exprimaient en revanche le CMH de classe II (Complexe majeur d'histocompatibilité) et des antigènes caractéristiques des cellules myéloïdes (Facchetti *et al.*, 1988). Les « cellules T plasmacytoïdes » ont alors été rebaptisées « monocytes plasmacytoïdes » (Facchetti and Vergoni, 2000; Facchetti *et al.*, 2003). Il a par la suite été montré que ces cellules peuvent se différencier en cellules dendritiques (DC) en présence d'IL-3 et de CD40 ligand (Grouard *et al.*, 1997). Les « monocytes plasmacytoïdes », présents dans le sang, ont alors été renommés « précurseurs de cellules dendritiques plasmacytoïdes ». Elles sont en effet proches des DC immatures avec la présence de marqueurs HLA-DR et CD123, mais n'expriment pas le marqueur spécifique des DC conventionnelles dérivées de monocytes, le CD11c (O'Doherty *et al.*, 1994). D'autre part, l'absence d'activité phagocytaire continuait à suggérer une origine lymphoïde. Grouard *et al.* les a ainsi renommées « cellules dendritiques plasmacytoïdes » ou « plasmacytoid dendritic cells » (pDC) en 1997 (Grouard *et al.*, 1997).

Parallèlement, il a été montré que même si après une infection virale, toutes les cellules sont capables de produire un antiviral puissant, l'interféron (IFN), un type cellulaire présent dans le sang était capable d'en produire bien plus que tous les autres. Ces cellules ont été nommées « cellules productrices d'interférons » ou IPC. Grâce à un phénotypage précis et une comparaison assidue de la morphologie et de la réponse IFN, il est apparu que les IPC et les pDC décrites par Grouard *et al.* n'étaient qu'un seul et même type cellulaire (Siegal *et al.*, 1999).

Les pDC, qui représentent seulement 0,2 à 0,7% des PBMC, ont ainsi la capacité de produire des grandes quantités d'IFN de type I (IFN-I), de 100 à 1000 fois plus que tous les autres

types cellulaires. Elles sont ainsi qualifiées de cellules professionnelles de la production d'interféron de type I.

Plus tard, les pDC ont également été identifiées chez les souris selon les marqueurs suivants : CD11c<sup>int</sup>, B220, LY6C, BST2 (Bone marrow Stromal cell antigen 2), Siglec-H. Cependant, les pDC murines sont très hétérogènes et certaines populations peuvent exprimer le marqueurs CD8 $\alpha$  et dans une moindre mesure CD4 (Naik *et al.*, 2005a). Les pDC ont aussi été identifiées chez les primates non humains (Coates *et al.*, 2003) et chez le rat (Hubert *et al.*, 2004).

### II. A. 2. Caractérisation de la morphologie des pDC humaines

Les pDC humaines ressemblent à des leucocytes et sont présentes à la fois dans le sang périphérique et dans la zone T des organes lymphoïdes secondaires. Elles sont plus petites que les monocytes CD14<sup>+</sup> mais plus grosses que les autres lymphocytes (taille comprise entre 8 et 10 $\mu$ m). Elles possèdent un noyau excentré en forme de haricot avec un petit cytoplasme contenant un réticulum endoplasmique (RE) rugueux, un appareil de Golgi volumineux et de nombreuses mitochondries. Les pDC non stimulées ont une forme homogène et ronde, de morphologie lymphocytaire alors que les pDC stimulées se regroupent en amas sous une forme plutôt allongée (Liu, 2005).

### II. A. 3. Phénotypage des pDC humaines

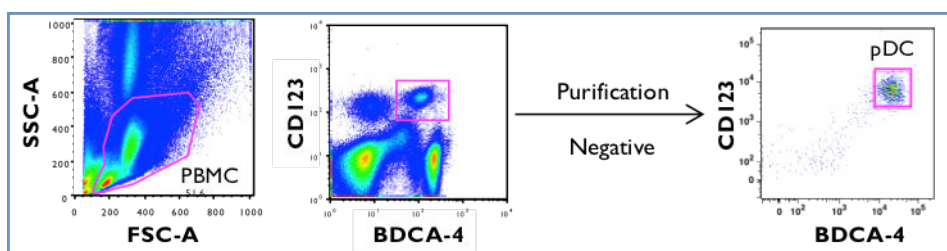
Les pDC humaines ont un phénotype très particulier par rapport aux autres lignées de cellules immunitaires. En effet, elles n'expriment pas les marqueurs de la lignée B (CD19, CD20, CD22), ni ceux des cellules NK (Natural Killer) (CD16, CD56, CD57), ni les marqueurs des cellules T (TCR, CD3, CD8, CD7, CD2), ni ceux des monocytes (CD14, CD16, CD11b, CD15). Elles expriment le CMH de classe II et quelques antigènes myéloïdes, sans pour autant exprimer les principaux marqueurs de la lignée myéloïde tels que CD11b, CD11c, CD14, CD13, CD16, CD33 ou CD35 (Dzionek *et al.*, 2002; Grouard *et al.*, 1997). Les pDC humaines expriment le marqueur CD4 et aussi les marqueurs HLA-DR et CD123 (chaîne alpha du récepteur à l'IL-3 qui est un facteur de survie pour les pDC) (Olweus *et al.*, 1997) mais aussi CD45RA, CXCR4, CCR5 et CXCR3.

En tant que cellules professionnelles de la production d'IFN type I, les pDC ont un rôle central dans la réponse innée immunitaire ce qui va induire l'expression membranaire de marqueurs d'activation (CD40 et TRAIL) et de maturation (CD80, CD83 and CD86) ainsi que le marqueur de migration CCR7 à leur surface (Forster *et al.*, 1999; Hardy *et al.*, 2007).

## II. A. 4. Marqueurs caractéristiques des pDC

Les pDC sont caractérisées par des marqueurs membranaires présents uniquement sur ces dernières : les lectines BDCA-2 (blood DC antigen 2) et BDCA-4 (Dzionek *et al.*, 2001). La découverte de ces marqueurs a permis d'identifier bien plus facilement les pDC dans les échantillons biologiques, et notamment dans le sang. BDCA-2 est une lectine C de type II impliquée dans l'internalisation, le traitement et la présentation des antigènes ainsi que dans la régulation de la production de l'IFN de type I. BDCA-4, aussi appelé neuropilin-1 (NP-1), est en revanche un récepteur neuronal qui appartient à la famille des sémaphorines de classe 3 et du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). En plus de son rôle primordial dans le guidage de l'axone dans le système nerveux, BDCA-4 semble essentiel dans l'initiation de l'interaction entre mDC (myéloïde DC) et lymphocytes T dans la réponse immunitaire (MacDonald *et al.*, 2002). BDCA-4 semble jouer un rôle essentiel dans l'interaction entre les pDC et les lymphocytes T folliculaires ( $T_{HF}$ ) (Dzionek *et al.*, 2002). Il est important de noter qu'en culture, BDCA-4 peut aussi être exprimé par les populations de DC dérivées de monocytes (MoDC), de DC dérivées de cellules souches CD34, et de DC conventionnelles CD11c<sup>+</sup> issues du sang périphériques. Contrairement aux mDC, les pDC n'expriment pas les récepteurs BDCA-1 et BCAD-3.

Il a aussi été montré plus récemment que l'ILT-7 est également un récepteur spécifique des pDC humaines (Cao *et al.*, 2006). ILT-7 appartient à la famille des ILT (immunoglobulin-like transcripts) qui sont composés d'un domaine immunoglobuline extracellulaire capable d'interagir avec les ligands et d'un domaine intracellulaire qui forme un complexe avec le récepteur aux immunoglobulines de type E de haute affinité,  $Fc\epsilon R1\gamma$ , qui possède un motif ITAM ce qui a pour conséquence la régulation négative de la production d'IFN-I.



**Figure 9 : Identification des cellules dendritiques plasmacytoïdes en cytométrie en flux**

Les principaux marqueurs membranaires spécifiques de ces cellules (CD4, BDCA-2 et BDCA-4 mais aussi CXCR4 et CCR5) sont régulés de façon négative après stimulation virale, notamment après activation par le VIH, ce qui complique le suivi de cette population cellulaire dans un contexte infectieux.

## II. A. 5. Ontogénie et origine des pDC

Le développement, la régulation ainsi que l'origine des pDC ne sont pas totalement élucidés. En effet, certaines études tendent à suggérer que les pDC ont la capacité unique de se différencier à la fois à partir de cellules myéloïdes progénitrices (CMP), en raison de la présence du récepteur IL-3R qui est caractéristique des progéniteurs précoces hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> mais aussi à partir de cellules lymphoïdes progénitrices (CLP) responsable de la formation des cellules lymphoïdes dont font partie les lymphocytes T, B, NK (Onai *et al.*, 2013). Dans tous les cas, leur développement est basé sur l'expression de facteurs clés de la différenciation. Tout d'abord, qu'elles soient d'origine myéloïde ou lymphoïde, le premier facteur nécessaire à leur différenciation est le ligand Flt-3L (fms-related tyrosine kinase 3(-3) ligand) (Naik *et al.*, 2005b), indispensable notamment pour activer les facteurs de transcription STAT3 (qui stimule l'expression de E2-2 dépendant de Flt-3L) et STAT5 (qui stimule l'expression de ID2 – un répresseur de E2-2), et la voie de signalisation de phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-mammalian target of rapamycin (mTOR). On peut remarquer qu'IRF8 (interferon regulatory factor), qui est lui aussi régulé par Flt-3L, est essentiel au développement des pDC. En effet, une mutation dans *IRF8* mène à la perte totale des pDC. Cependant, la voie de signalisation moléculaire utilisée par Flt-3L pour induire le développement des pDC reste mal connue. D'autre part, le développement des pDC à partir des pré-pDC dépend de trois étapes :

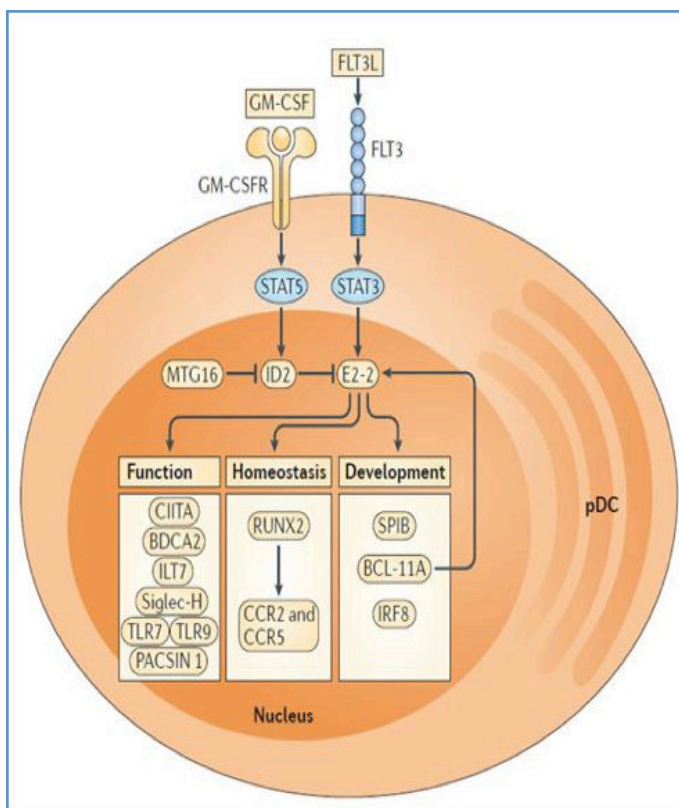
(1) L'augmentation de l'expression du facteur E2-2 (basic helix-loop-helix transcription factor) entraîne la différenciation des progéniteurs en pDC (Cisse *et al.*, 2008). E2-2 est aussi important pour établir l'expression des gènes spécifiques de la lignée pDC que pour inhiber des programmes propres à d'autres lignées. Le facteur E2-2 induit aussi l'expression de nombreux gènes associés à la fonction (TLR7, TLR9, IRF7), au développement des pDC (IRF8 et PACSIN-1 (protein kinase C et casein kinase substrate in neurons 1)). E2-2 régule également l'expression de marqueurs spécifiques (induction de BDCA-2, ILT-7 et LILRA4 (leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 4) mais inhibition de CD11c) (Cisse *et al.*, 2008).

(2) L'expression du facteur de transcription SpiB (un membre de la famille d'Ets), qui par ailleurs est contrôlée par E2-2 et qui lui-même contrôle l'expression du gène anti-apoptotique Bcl2-related protein A1 (Bcl2A1). Il a été montré que son expression est nécessaire à la maturation complète des pDC dans la moelle osseuse (Schotte *et al.*, 2004).

(3) La troisième molécule essentielle au développement des pDC implique un marqueur spécifique des pDC, Runx2 (runt-related transcription factor 2). Runx2 est essentiel pour la migration des pDC matures de la moelle osseuse vers la périphérie, ce qui dépend aussi des récepteurs aux chimiokines CCR5 et CCR2 (Sawai *et al.*, 2013).

Martin-Martin *et al.* ont identifié trois stades de pré-pDC (stade I, II et III), chacun associé à un stade de plus en plus mature, et caractérisé par la perte progressive de CD34 corrélée à l'augmentation de CD123 et HLA-DR. Dès les premiers stades, les pDC expriment BDCA-4 alors que BDCA-2 apparaît plus tard. D'autre part, il a aussi été montré que durant les stades précoces de la différenciation, les pDC expriment à la fois les marqueurs de cellules progénitrices hématopoïétiques mais aussi de la lignée myéloïde, marqueurs qu'elles perdent relativement rapidement lors des étapes de maturation. Les pDC acquièrent leur fonction antivirale productrice d'IFN seulement à la fin du stade III (Martin-Martin *et al.*, 2009).

## II. A. 6. Localisation, migration et temps de vie des pDC



**Figure 10 : Développement des pDC dans la moelle osseuse.** Les pDC sont dérivées des cellules souches hématopoïétiques (HSC). Elles peuvent se différencier à la fois à partir des CMP et des CLP. La kinase FLT-3 joue un rôle crucial dans ce processus. Trois étapes clés ont lieu dans le développement des pDC : (1) E2-2 induit la transcription des gènes spécifiques des pDC (IRF8, SpiB et IRF7) tout en inhibant ceux non-spécifiques (CD11); (2) SpiB permet la maturation complète des pDC dans la moelle osseuse ; (3) Runx2 est nécessaire à la migration des pDC en périphérie.

Modifié à partir de (Kang and Lee, 2011).

Les pDC se développent entièrement dans la moelle osseuse puis entrent dans le flux sanguin. Au stade initial de leur développement, les pDC humaines sont présentes dans le thymus et dans tous les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, amygdales, rate, thymus, moelle épinière, plaques de Peyer) (Okada *et al.*, 2003), mais il est difficile de les localiser dans les tissus périphériques. Cependant, il a été montré que les pDC étaient abondantes notamment dans l'intestin (Wendland *et al.*, 2007). Elles joueraient ainsi un rôle important dans la détection précoce de pathogènes dans ces tissus périphériques. Les molécules associées aux pathogènes, notamment les ARN viraux, ou des médiateurs inflammatoires, tels que l'IL-1, induisent le déplacement des pDC. En effet, on observe d'une part une accumulation des pDC dans les tissus d'où proviennent

ces signaux, et d'autre part leur migration dans les ganglions lymphatiques drainants. Elles sont aussi abondantes dans les ganglions lymphatiques associés à un état inflammatoire (Cella *et al.*, 1999). L'accumulation des pDC se fait tout d'abord dans les tissus infectés puis dans les ganglions correspondants. (GeurtsvanKessel and Lambrecht, 2008). Le rôle migratoire des pDC est plutôt assimilé à un rôle de présentation d'antigène et d'immunomodulation sur les sites infectés et dans les ganglions drainants plutôt qu'un rôle de transport d'antigène.

Pour se déplacer du sang vers les ganglions, les pDC répondent très fortement aux chimiokines. Après une stimulation virale ou par le ligand CD40, les pDC deviennent matures et expriment CCR7 de façon fonctionnelle afin de pouvoir répondre aux ligands CCL19 et CCL21 exprimés dans les HEV (High Endothelial Venules) et dans les constituants des organes lymphoïdes secondaires. De plus, les pDC expriment le CD62L qui reconnaît spécifiquement les ligands PNA<sup>d</sup> (Peripheral Node Addressin = MECA-79) dans les HEV. Ces observations, permettent de mieux comprendre la localisation des pDC autour des veinules post-capillaires à endothélium épais (HEV) et des zones T des ganglions. En effet, les pDC se déplacent dans les zones lymphocytaires à travers les HEV et non à travers les canaux lymphatiques afférents. Elles répondent de façon très efficace au ligand de CXCR4, le CXCL12 (SDF-1) qui est exprimé dans les ganglions, les HEV et les cellules tumorales. Les pDC pourraient ainsi migrer dans un premier temps vers les organes lymphoïdes secondaires plutôt que vers les sites inflammatoires (Penna *et al.*, 2001). Des infiltrations de pDC sont observées dans de nombreux tissus lors de pathologies cancéreuses, auto-immunes ou virales (Sozzani *et al.*, 2010). Dans le même temps, les pDC sécrètent de hauts niveaux de chimiokines pro-inflammatoires qui pourraient attirer d'autres pDC dans les ganglions lymphatiques, induisant la formation d'amas (Krug *et al.* 2002).

## II. A. 7. Modèles de lignées cellulaires des pDC

Les lignées de pDC ont été tout d'abord développées pour essayer de passer outre le faible nombre de pDC primaires. Trois modèles de lignées cellulaires des pDC ont été décrites et sont souvent utilisées pour étudier les fonctions des pDC : les Gen2.2 (Chaperot *et al.*, 2006), les CAL-1 (Maeda *et al.*, 2005) et les PMDC05 (Narita *et al.*, 2009). Leurs caractéristiques principales sont présentées dans le tableau I. On peut noter que les PMDC05 représentent une population hétérogène de cellules composées par des cellules primaires de pDC (BDCA1-CD123+) mais aussi une minorité de cellules cDC (Conventional DC) (BDCA1+DC123-). Ces trois lignées possèdent TLR7 et TLR9, mais elles peuvent aussi exprimer d'autres TLR. Elles sont toutes capables de répondre normalement en termes de production d'IFN $\alpha$  et de TNF $\alpha$ . Cependant, la production d'IFN $\alpha$  en réponse à des ligands synthétiques de TLR7 (CL097 et R848) est altérée à

cause de l'activation trop courte de la kinase I $\kappa$ B (IKK $\beta$ ). Seule la grippe est capable d'induire des quantités détectables d'IFN-I dans ces trois lignées. D'autre part, la production d'IFN $\alpha$  par les Gen2.2 dépend de la production en premier lieu de l'IFN $\beta$ , qui une fois sécrété dans le milieu de culture active la voie des IFNAR (IFN Receptor), phénomène qui a lieu dans toutes les cellules immunitaires sauf dans les pDC primaires. Les PDCM05 répondent au LPS (lipopolysaccharide), ce qui n'est pas le cas des pDC primaires.

<b>Modèle de lignée cellulaire de pDC</b>	<b>CAL-1</b>	<b>Gen2.2</b>	<b>PMDC05</b>
<b>Origine</b>	Université de Nagasaki, Japon	INSERM, Grenoble, France	Université de Niigata, Japon
<b>Patient</b>	Homme de 76 ans	Homme de 74 ans	Homme de 67 ans
<b>Maladie</b>	Lymphome blastique de cellules NK	pDC dérivés d'une leucémie aiguë	pDC dérivés d'une leucémie aiguë
<b>Phénotype</b>	CD3-CD19-CD14-CD16 CD123+CD11c+CD56+ BDCA2+	CD3-CD19-CD14-CD16 CD123+CD11c+CD56+ BDCA2+	CD3-CD19-CD14-CD16 CD123 $\pm$ CD11c $\pm$ CD56+ BDCA2+
<b>Expression de TLR</b>	TLR7/9 - TLR2/4	TLR7/9 - TLR6/10	TLR7/9 - TLR1/2/3/4/8
<b>Production de cytokines</b>	IFN $\alpha$ /TNF $\alpha$ après stimulation par CpG - IFN $\alpha$ après stimulation par FLU Pas d'IFN $\alpha$ après stimulation avec des ligands synthétiques deTLR7		

**Table I : Caractéristiques des lignées cellulaires des pDC**

Bien que les lignées de pDC soient utiles pour appréhender certaines fonctions des pDC, leurs réponses induites par les voies de TLR restent éloignées des pDC primaires. Ainsi, les pDC primaires restent le seul modèle fiable pour étudier les réponses aux TLR.

## **II. B. CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE DES pDC DANS L'IMMUNITÉ**

### **II. B. 1. Rôle des pDC dans l'immunité innée après reconnaissance des pathogènes**

En tant que cellules professionnelles de la production d'interféron, les pDC sont la première ligne de défense de l'immunité innée contre les pathogènes. Elles sont capables de s'activer, de maturer et d'acquérir leur fonction de cellules présentatrices d'antigènes professionnelles ou pro-APC (Antigen Presenting Cells). Afin d'assurer la protection rapide et efficace de notre organisme, les pDC reconnaissent les pathogènes *via* les PRR comme les Toll-Like Receptors (TLR). La capacité de détection des pDC est fortement restreinte aux ssRNA et dsDNA, elles produisent mille fois plus d'interféron que les autres types cellulaires (Siegal *et al.*, 1999). En effet, les pDC produisent très rapidement de très grandes quantités (1 à 2 unités par cellule soit 3 à 10 pg par cellule par 24h) de tous les sous-types d'IFN de type I (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\epsilon$ , IFN $\omega$  and IFN $\tau$ ) (Ito *et al.*, 2007). De plus, il a été montré que les ARNm (ARN messager) qui codent pour l'IFN-I représentent 60% de tous les ARNm présents dans ces cellules seulement 6 heures après stimulation (Ito *et al.*, 2006).

Hormis l'IFN de type I, les pDC sont capables de produire différentes chimiokines en quantités importantes telles que CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL5 (RANTES), CXCL-9 (MIG), CXCL-10 (IP-10), CXCL-11 (I-TAC), CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ), IFITM (Interferon-induced transmembrane proteins) (Penna *et al.*, 2002), mais aussi des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$ , IL-1R $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-8. En revanche, elles ne produisent que très peu d'IL-12 contrairement aux DC conventionnelles (Osawa *et al.*, 2006). Il a aussi été montré que les pDC produisent de l'interféron de type III (IFN $\lambda$ 1, IFN $\lambda$ 2, IFN $\lambda$ 3) (Coccia *et al.*, 2004). Ces derniers résultats indiquent que les pDC, en plus d'avoir des fonctions antivirales liées à la production d'IFN-I, possèdent aussi un rôle central dans l'inflammation et dans le trafic cellulaire.

### **II. B. 2. Capture et présentation de l'antigène**

Les pDC expriment les CMH de classe I et II (Kool *et al.*, 2011), ainsi que les molécules co-stimulatrices CD40, CD80 et CD86 (Reizis *et al.*, 2011; Villadangos and Young, 2008). Les pDC sont ainsi capables de présenter des antigènes, mais moins efficacement que les cDC. Cependant, les pDC sont capables de présenter continuellement les antigènes viraux endogènes lorsqu'elles sont activées. La présentation antigénique par les pDC peut amener selon le contexte à l'activation ou à la tolérance des lymphocytes T CD4+, à l'induction de la polarisation des lymphocytes Th1 et



induire les réponses des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Lorsque les pDC reçoivent un signal d'activation par leur TLR, elles ont un rôle immunogénique. Lorsque les pDC sont non-stimulées ou activées par d'autres mécanismes – indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) (Boasso *et al.*, 2007a), ICOSL (Inductible costimulator ligand) (Ito *et al.*, 2007), OX40L (connu sous le nom de TNFSF4) (Diana *et al.*, 2009), programmed cell death protein 1 ligand 1 (PDL1) (Diana *et al.*, 2011) et le granzyme B – elles induisent plutôt une tolérance vis-à-vis des cellules tumorales, des allo-antigènes et des antigènes inoffensifs. Quand les pDC se différencient en APC matures, elles perdent leur capacité à produire de l'IFN-I mais voient leurs CMH de classe I et II augmentés ainsi que le récepteur de migration CCR7 et les molécules co-stimulatrices CD40, CD83, CD80 et CD86

Les pDC ont la capacité de présenter efficacement des antigènes *via* les CMH-I ou II, dérivés de virus endocytés par les pDC, comme par exemple dérivés du virus de la grippe (Fonteneau *et al.*, 2003). Ainsi la stimulation par un virus de la grippe induit le déplacement des molécules du CMH de classe I vers la surface membranaire dans les 30 minutes qui suivent la stimulation et cross-présente les antigènes de la grippe aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans les 4h (Di Pucchio *et al.*, 2008). En revanche, la capacité des pDC à présenter les antigènes exogènes est faible, en raison probablement de leur faible activité phagocytaire (Niessner *et al.*, 2006). Une étude suggère que les pDC pourraient capturer les antigènes exogènes *via* BDCA-2 ou ILT-7 en se liant à la protéine adaptatrice FcεRIγ par laquelle il transmettrait son signal (Cao *et al.*, 2006), dans le sang et les tissus lymphoïdes, pour l'apprêter et le présenter aux cellules T (Dzionek *et al.*, 2001). Contrairement aux DC conventionnelles, les pDC ne possèdent pas le récepteur responsable de l'endocytose des antigènes de type mannoses présents sur certains virus, la lectine DC-SIGN.

Des études récentes montrent que les pDC qui capturent l'antigène dans les tissus périphériques utilisent CCR9 pour migrer vers le thymus où elles induisent la suppression des thymocytes spécifiques de l'antigène, ce qui contribue à la tolérance immunitaire (Hadeiba *et al.*, 2012; Wendland *et al.*, 2007; Wurbel *et al.*, 2011).

### II. B. 3. Interactions avec les autres cellules de l'immunité

Il est maintenant bien connu que les pDC, une fois matures, sont capables de déclencher une réponse des lymphocytes T, naïfs et mémoires, après une infection ou une immunisation. Selon leur état de maturation, la nature et la concentration de l'antigène, les pDC peuvent activer de façons différentes les lymphocytes T (Boonstra *et al.*, 2003). Après stimulation virale, les pDC activées peuvent induire la transformation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en lymphocytes T cytotoxiques (Fonteneau *et al.*, 2003).

Elles induisent également une polarisation Th1 de la réponse lymphocytaire, induisant les cellules T CD4<sup>+</sup> à produire de larges quantités d'IFN $\gamma$  et d'IL-10 (Kadowaki *et al.*, 2000). D'autre part, les pDC exprimant le ligand costimulateur OX40L et produisant peu d'IFN-I, permettent plutôt une polarisation Th2, *via* un mécanisme dépendant d'OX40L (Ito *et al.*, 2004), induisant les cellules T à produire de l'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13. Une troisième orientation des lymphocytes T naïfs peut s'effectuer. En effet, les lymphocytes T naïfs peuvent être polarisés vers Th17 suite à une stimulation par des cytokines telles que le TGF $\beta$  (Transforming growth factor) et l'IL-6. Les lymphocytes Th17 sécrètent les cytokines IL-17A, IL-17F, IL-6, et TNF $\alpha$ , ainsi que des chimiokines pro-inflammatoires, et pourraient avoir un rôle dans la lutte contre les pathogènes différents de ceux ciblés par les Th1.

Les pDC peuvent également induire l'activation des lymphocytes B en plasmocytes. La réponse contre un pathogène par les lymphocytes B se traduit par la production massive d'anticorps, qui est dépendante de la présence des pDC (Jego *et al.*, 2003). D'autre part, la sécrétion d'IFN-I et d'IL-6 par les pDC agit sur les lymphocytes B afin qu'ils se différencient en cellules spécifiques de la production d'anticorps, les plasmocytes matures (Jego *et al.*, 2003).

D'autre part, les pDC sont des productrices importantes de chimiokines pro-inflammatoires, comme CCL3, ce qui va permettre le recrutement d'autres leucocytes aux sites inflammatoires. Avec la sécrétion de l'IFN-I, les pDC peuvent augmenter la cytotoxicité des cellules NK, leur capacité à produire de l'IFN $\gamma$  et protéger les DC contre les effets cytopathologiques des virus, en améliorant leur fonction présentatrice d'antigènes.

#### II. B. 4. Les fonctions cytotoxiques des pDC

Les fonctions cytotoxiques des pDC passent par différentes voies de signalisation, notamment indirectement par la sécrétion de l'IFN-I et directement par la voie du granzyme B (GrB) (Jahrsdorfer *et al.*, 2010). Le promoteur du gène codant pour TRAIL (Tumor Necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand ou TNFSF10), un ligand pro-apoptotique de la famille du TNF, possède en effet un ISRE. TRAIL est ainsi induit par l'IFN-I produit par des pDC *via* l'engagement du récepteur IFNAR1/2 et l'activation des voies JAK/STAT et PI3K. L'expression de TRAIL permet ainsi aux pDC de tuer les cellules infectées sensibles à TRAIL telles que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectés par HIV-1 (Hardy *et al.*, 2007; Herbeuval *et al.*, 2005a; Herbeuval *et al.*, 2005b; Herbeuval *et al.*, 2006) et les cellules tumorales qui expriment les récepteurs de mort pour TRAIL (DR) (Drobits *et al.*, 2012). L'IFN-I peut aussi induire l'expression d'un autre ligand pro-apoptotique, CD95L (ou FASL), qui participe également à l'activité cytotoxique des pDC (McNab *et al.*, 2015). Les propriétés cytotoxiques des pDC activées peuvent être régulées

positivement par l'IL-3 dans des conditions inflammatoires. Les pDC humaines expriment constitutivement la protéase sérine GrB mais pas la perforine (Jahrsdorfer et al., 2010). Il a été montré que les pDC tuent les cellules erythroleucémiques de la lignée cellulaire K562 de façon GrB dépendante en passant pas la cascade des caspases. De façon intéressante, les ligands de TLR7/9 réduisent de façon significative l'expression de GrB dans les pDC.

### II. B. 5. Le rôle immunorégulateur des pDC

La majorité du temps, les pDC activées par TLR7 ou TLR9 activent la réponse immunitaire. Cependant, il a aussi été montré que les pDC stimulés pouvaient jouer un rôle tolérogène en induisant une tolérance vis-à-vis des cellules tumorales, de certains antigènes et des allo-antigènes. Les pDC sont attirées vers les cellules tumorales qui produisent de grandes quantités de CXCL12, et une fois dans ce microenvironnement tumoral, elles vont induire la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes T régulateurs (Treg) producteurs d'IL-10 (Zou et al., 2001a; Zou et al., 2001b). Ce phénomène va promouvoir la tolérance au lieu d'induire une réponse anticancéreuse.

Les mécanismes utilisés par les pDC afin d'établir une tolérance ont maintenant été élucidés. Les pDC expriment l'enzyme immunorégulatrice IDO, qui va cataboliser le tryptophane et épuiser ainsi le pool de cet acide aminé essentiel nécessaire à la prolifération des lymphocytes T (Boasso et al., 2007a). En plus de l'IDO, l'expression du ligand costimulateur inductible ICOS-L sur les pDC activées induit la différenciation des lymphocytes T naïfs en Treg producteur d'IL-10. La sécrétion d'IFN-I peut amplifier ce processus (Boasso et al., 2007b). D'autre part, les pDC utilisent aussi la sécrétion de granzyme B afin de supprimer la prolifération des lymphocytes T ; ce mécanisme est amplifié par la présence d'IL-3 et IL-10 mais inhibé par la signalisation de TLR ou de CD40L. Les pDC peuvent aussi exprimer OX40L (TNFSF4) et PDL1 afin de promouvoir la tolérance envers les cellules tumorales, les allo-antigènes et les antigènes inoffensifs.

## **II. C. RÉGULATION NÉGATIVE DE LA RÉPONSE DES PDC**

### II. C. 1. Rôle de ITAM et ITIM dans l'activation des pDC

Les pDC expriment un large panel de récepteurs membranaires qui régule l'amplitude de la réponse IFN-I aux ligands de TLR7 ou 9. Les récepteurs des pDC qui induisent un signal par ITAM ou ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibition) contrôlent l'amplitude de la sécrétion d'IFN-I

en réponse aux ligands de TLR mais aussi le degré d'activation des pDC. Même si les récepteurs qui induisent un signal *via* ITAM activent les cellules et ceux qui signalisent *via* ITIM inhibent l'activation des pDC, cette règle n'est pas toujours appliquée pour les pDC et est même souvent inversée. Sur les pDC humaines, les récepteurs qui induisent un signal en utilisant ITAM ou ITIM sont : BDCA-2, ILT7, NKp44, DCIR, FcγRIIA (CD32) et CD300a/c. On peut les séparer en deux catégories (voir II. D. 2 et II. D. 3.). Le mécanisme par lequel ces complexes peuvent réguler l'activation des pDC reste encore méconnu. Cependant, la plupart des récepteurs vont être internalisés après la fixation de leur ligand, ce qui va jouer un rôle sur l'organisation membranaire. D'autre part la signalisation d'ITAM et ITIM ont d'importants impacts sur le réarrangement du cytosquelette et le déplacement des vésicules. Or, le réarrangement vésiculaire et membranaire des pDC est essentiel pour son activation (formation d'endosomes contenant les TLR mais aussi les ligands, recyclage des récepteurs des pathogènes). Il est donc probable que l'activation des ITAM et des ITIM altère la régulation spatio-temporelle de TLR7 et TLR9 (Yoshizaki *et al.*, 2009).

### II. C. 2. Récepteur de surface possédant un ITAM

Le premier groupe inclus les récepteurs membranaires qui ne signal pas d'eux mêmes mais délivrent des signaux intracellulaires à travers un adaptateur, souvent par le DNAX activation protein 12 (DAP12) ou la chaîne  $\gamma$  du récepteur Fc pour les IgE (FcεRI $\gamma$ ). Ces adaptateurs possèdent un motif intracellulaire ITAM, qui après fixation au bon récepteur, se phosphorylent et recrutent la protéine tyrosine kinase Syk. ITAM, qui possède une séquence consensus de type YxxL/I-(x)6-8-YxxL/I (x = acides aminés quelconques), est utilisé par divers récepteurs pour activer les cellules immunitaires (Blasius *et al.*, 2006a).

BDCA-2 est une lectine de type C qui s'associe au FcεRI $\gamma$ . Le « cross-linking » de BDCA-2 inhibe la production d'IFN-I en réponse aux agonistes de TLR (Dzionek *et al.*, 2001). En effet, les anticorps spécifiques de BDCA-2 sont rapidement internalisés par les pDC et sont transformés en peptides qui vont être présentés par le MHC II aux lymphocytes T. Röck *et al.* ont montré que les pDC exprimaient diverses molécules de signalisation qui ont initialement été trouvées dans les lymphocytes B. Lorsque BDCA-2 est activée, la phosphorylation de Syk, Bruton's tyrosine kinase (BTK), l'adaptateur B-cell linker (BLNK = SLP65) va engendrer des messagers secondaires DAG et IP3, qui vont alors activer la protéine kinase C (PKC) et la mobilisation calcique (Rock *et al.*, 2007).

ILT7 est un marqueur spécifique des pDC de la superfamille des immunoglobulines qui va aussi s'associer avec le FcεRI $\gamma$ . De la même façon, le « cross-linking » de ITL7 avec un anticorps monoclonal anti-ILT7 immobilisé inhibe la production d'IFN-I et de TNF $\alpha$  en réponse aux

agonistes de TLR mais n'a pas d'effet sur la maturation des pDC. Il a été montré que le ligand spécifique d'ILT7 est BST2, aussi connu sous le nom de tétherine (Cao *et al.*, 2009). BST2 est une protéine transmembranaire induite par l'IFN-I qui bloque le relargage des virus à enveloppe par les cellules infectées (Neil *et al.*, 2008). Il a par ailleurs été montré par Tokarev *et al.*, en 2013 que BST2 pouvait déclencher la réponse NF- $\kappa$ B en recrutant TAK1 et TAB1 *via* sa queue cytoplasmique (Tokarev *et al.*, 2013). BST2 a donc un rôle complexe dans la réponse immunitaire des pDC. Ainsi dans la revue de Gilliet *et al.*, les auteurs ont proposé un modèle sur le rôle de BST2 dans un modèle viral et un modèle cancéreux : (1) En présence d'un virus, les pDC produisent une grande quantité d'IFN-I, ce qui va engendrer l'expression de BST2 sur les cellules environnantes ; BST2 va alors pouvoir se fixer sur son récepteur ILT7 présent sur les pDC activées, ce qui aura pour conséquence la diminution de la production d'IFN-I. (2) BST2 est exprimé constitutivement sur les cellules tumorales. Les pDC fonctionnelles infiltrées vont alors voir leur réponse IFN-I très grandement diminuée, en réponse à l'interaction ILT7-BST2 (Gilliet *et al.*, 2008).

NKp44 est un Ig-like receptor (ILR) qui utilise l'adaptateur DAPI2. NKp44 est exprimé de façon constitutive sur les NK et les pDC dans les amygdales et est induit sur les NK et les pDC du sang par IL-2 et IL-3 (Fuchs *et al.*, 2005). Alors que NKp44 fonctionne comme un récepteur activateur sur les NK, le cross-link de NKp44 sur les pDC les inhibe.

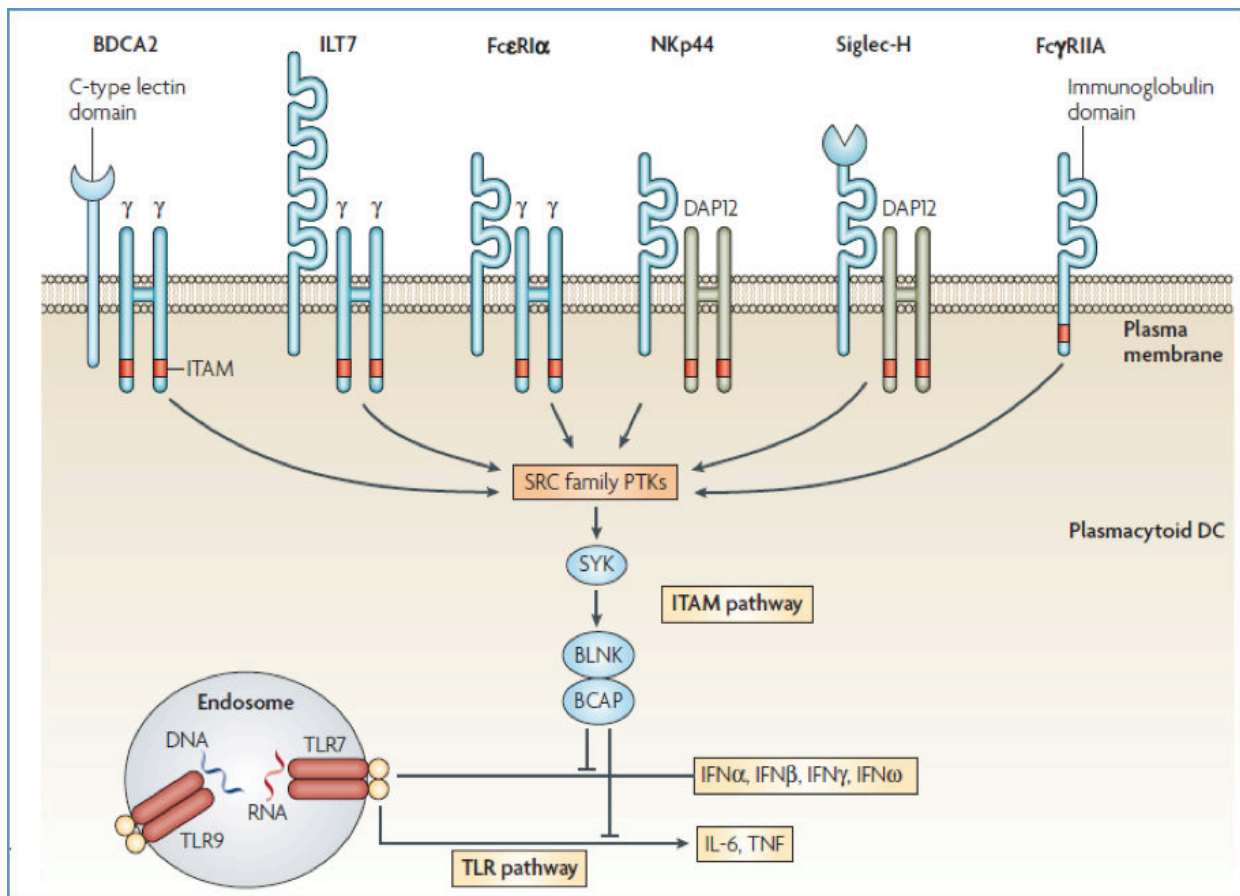
### II. C. 3. Récepteur de surface possédant un ITIM

Le deuxième groupe de récepteurs inclus des molécules de surface qui possèdent un motif intracellulaire ITIM. ITIM possède une séquence consensus de type I/V/L/S-x-Y-xx-L/V (x = acides aminés quelconques). Après la fixation aux récepteurs, ITIM se phosphoryle et recrute les phosphatases kinases SHP-1 et SHP-2 et/ou la phosphatase phosphatidyl inositol SHIP1/2.

L'immunorécepteur des cellules dendritiques (DCIR) est une lectine de type C associé à un ITIM exprimé par les pDC et de la même façon que les récepteurs précédemment détaillé, inhibe la production d'IFN. Par ailleurs, DCIR a aussi un rôle de capture de l'antigène.

Les membres de la famille des glycoprotéines de CD300 sont des récepteurs transmembranaires avec un domaine extracellulaire de type IgV. Le domaine transmembranaire chargé de CD300b/c/d/e permet son association avec l'adaptateur DAPI2 qui contient un ITAM, alors que le domaine cytoplasmique de CD300a/f contient un ITIM. Le cross-linking des CD300a/c inhibe l'expression de HLA-DR, TNF $\alpha$  et IL6 alors qu'il augmente l'expression d'IRF7 et de la sécrétion d'IFN-I par les pDC. Les pDC expriment de grandes quantités de CD300a mais pas de

CD300c, ce qui favorise la voie de ITIM (Cao and Bover, 2010). Cependant, ces résultats semblent contradictoires avec le rôle des ITAM/ITIM nécessite d'être approfondi.



**Figure 11 : Les récepteurs régulateurs des pDC et la voie de signalisation des ITAM régulatrice des TLR.** Trois récepteurs de surface BDCA-2 (blood dendritic cell (DC) antigen 2), ILT7 (immunoglobulin-like transcript 7) et FcεRIα (high-affinity Fc receptor for IgE) s'associent avec la γ-chaine du FcεRI, qui comporte un ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif), sur les pDC, afin d'activer la voie de signalisation incluant SRC, SYK, BTK et BLNK. L'activation de cette voie de signalisation inhibe la production d'IFN et de cytokines par les pDC en réponse à l'activation des TLR.

Modifié à partir de (Gilliet et al., 2008)

### **III. IMPLICATION DES pDC, DE L'INTERFERON ET DE TRAIL EN PHYSIOPATHOLOGIE : UN RÔLE À DOUBLE TRANCHANT**

Afin d'étudier les différentes pathologies, divers modèles murins ont été mis en place. Cependant, les pDC murines ont des phénotypes différents des pDC humaines et peuvent répondre différemment en fonction des pathologies ; il est ainsi indispensable de garder un œil critique sur les résultats obtenus. Le modèle murin est cependant important pour tester de nouvelles thérapies.

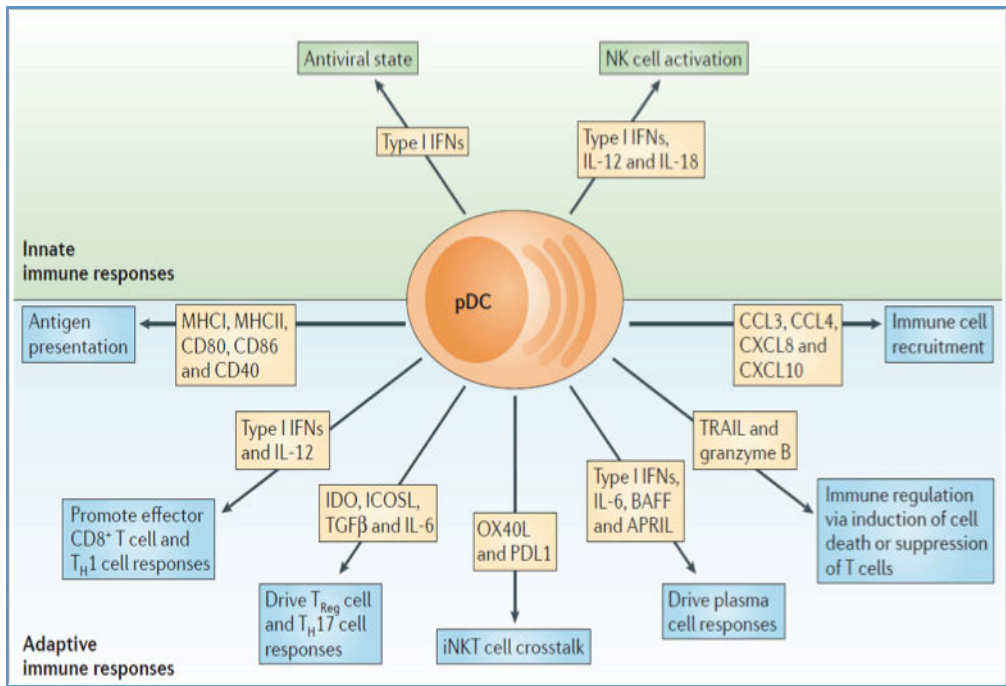
#### **III. A. GÉNÉRALITÉS**

Les propriétés antivirales et immunitaires de l'IFN de type I pendant des infections virales bactériennes aiguës sont bien connues. Cependant, le rôle de la réponse IFN-I dans de nombreuses maladies auto-immunes, dans les infections virales chroniques reste à être mieux élucidé. Par exemple, une réponse chronique de l'IFN-I est associée avec des maladies auto-immunes comme le Lupus érythémateux disséminé (systemic lupus erythematosus = SLE), le syndrome de Sjogren, les scléroses systémiques, la myosite et l'arthrose rhumatoïde. Les variants alléliques, associés à ces maladies, se retrouvent principalement sur les gènes de la voie de signalisation de l'IFN et dans les séquences ISRE qui sont présents dans les promoteurs et les amplificateurs du génome. D'autre part, il a été mis en évidence qu'il existait une signature spécifique de l'IFN-I chez les patients qui sont chroniquement infectés avec HCV et le VIH. Plus récemment et de façon surprenante, il a été montré que cette signature était aussi associée avec une augmentation de l'activité de certaines maladies chroniques mycobactériennes comme la tuberculose et la lèpre (de Paus *et al.*, 2013; Manca *et al.*, 2001). Le rôle de l'IFN est donc extrêmement complexe et, en fonction de l'environnement, semble affecter la pathogénèse de la maladie.

Plusieurs études récentes ont montré que l'IFN-I peut avoir un rôle plutôt suppresseur dans la phase chronique d'infections comme LCMV (Lymphocytic choriomeningitis virus) pour la souris (Teijaro *et al.*, 2013; Wilson *et al.*, 2013), la tuberculose et la lèpre (Manca *et al.*, 2005). D'autre part, il a été montré dans d'autres modèles que l'induction de l'IL-10 inhibait les protections antimicrobiennes par l'IFN $\gamma$  qui permettent l'élimination des pathogènes (Teles *et al.*, 2013). Toutes ces études suggèrent que, quand les infections virales ou bactériennes ne peuvent

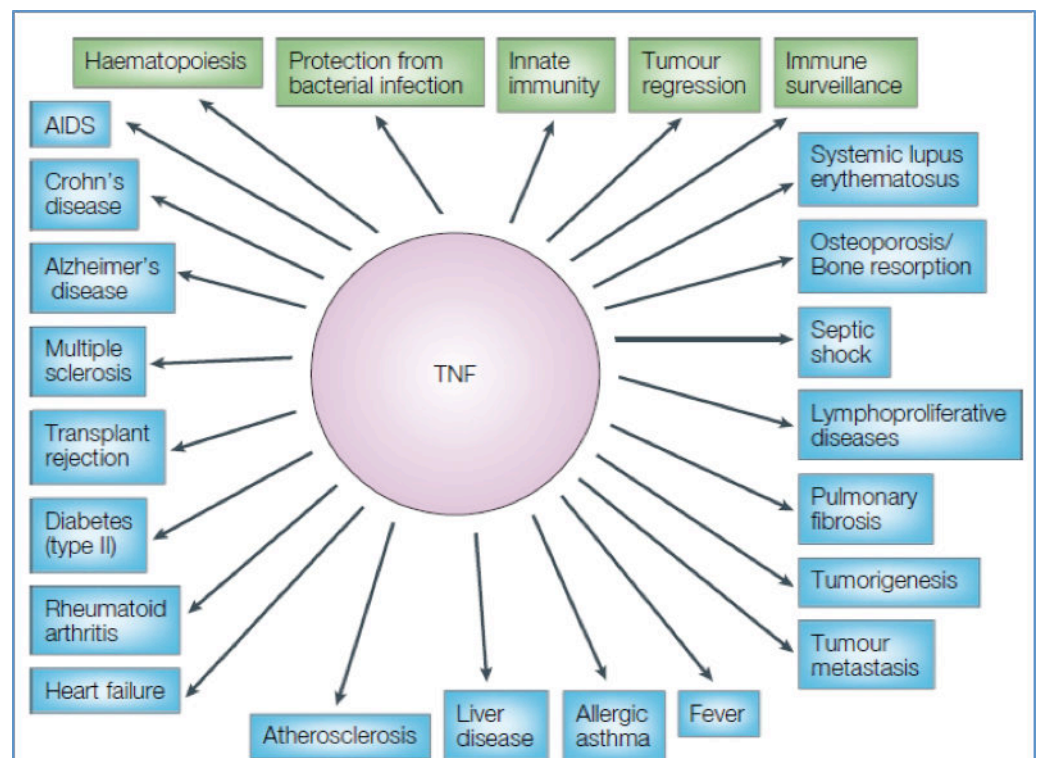
pas être éliminées, la voie persistante de l'IFN-I adopte un rôle plutôt immunosuppresseur, probablement dans le but de limiter la toxicité et donc la morbidité due aux maladies persistantes.

Cependant, ce rôle immunosuppresseur bloque aussi d'autres réponses indispensables à l'élimination des pathogènes et à la protection de l'organisme. Ainsi, le rôle de l'IFN dans les maladies chroniques doit être réévalué tout comme l'utilisation des thérapies qui bloquent l'IFN-I afin d'augmenter l'immunité spécifique et d'éliminer les maladies chroniques.



**Figure 12: Les pDC sont le lien entre l'immunité innée et adaptative.**  
Modifié à partir de (Swiecki and Colonna, 2015)

**Figure 13: Les principaux effets physiologiques et pathologiques des membres de la superfamille du TNF.**  
En bleu, les pathologies dans lesquelles TRAIL à des effets délétères et en vert celles dans lesquelles TRAIL à des effets bénéfiques  
Modifié à partir de (Aggarwal, 2003)





### III. B. LES INFECTIONS VIRALES

#### III. B. I. Le rôle protecteur de l'IFN dans les infections virales

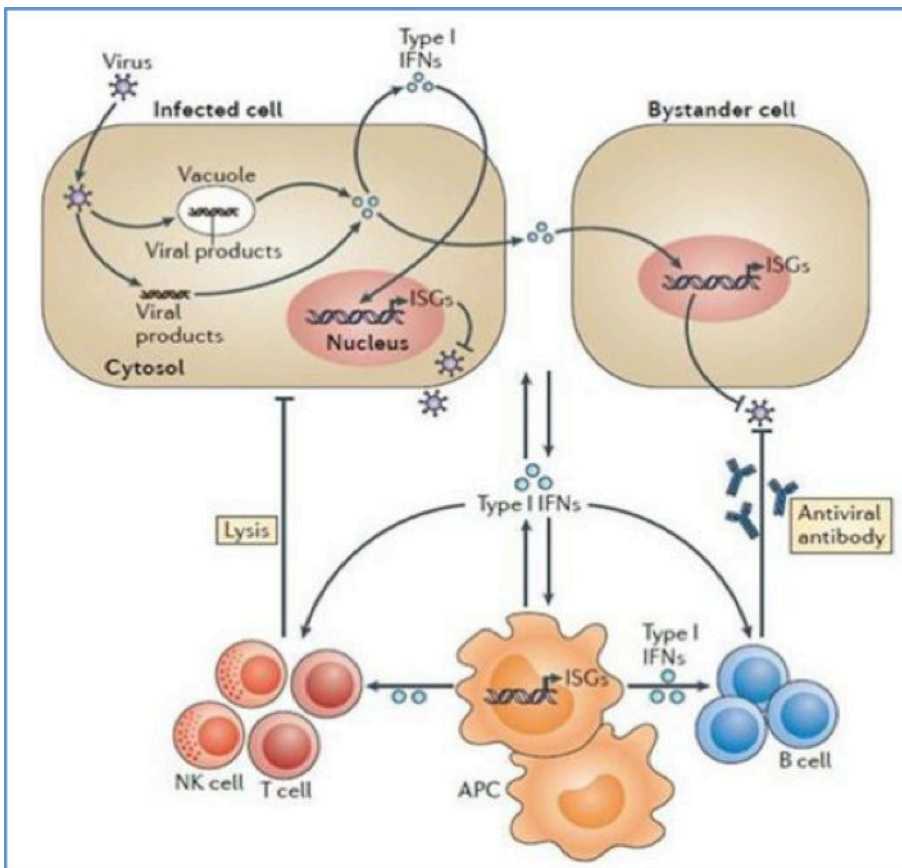
Les IFN ont été nommés d'après leur capacité « à interférer » avec la réplication virale dans les cellules. Cette capacité de l'IFN $\alpha/\beta$  à restreindre la réplication virale est largement attribuée à l'induction des ISG. Ces gènes sont exprimés soit constitutivement dans les cellules en réponse à de faibles doses d'IFN $\alpha/\beta$  dans le microenvironnement, soit, plus généralement, en réponse à l'IFN $\alpha/\beta$  produit après une infection, pendant laquelle l'IFN $\alpha/\beta$  induit un état antiviral dans les cellules environnantes et restreint le cycle de la réplication virale dans les cellules déjà infectées. La plupart des virus dévouent une grande partie de leur génome à des mécanismes qui perturbent la production de l'IFN $\alpha/\beta$  ou les voies de signalisation induites par l'IFN $\alpha/\beta$ , en inhibant ainsi l'induction des ISG. Cette observation illustre l'importance de cette famille de cytokines dans la protection cellulaire contre les infections virales. Le mécanisme d'action de beaucoup de ces ISG a largement été décrit ; on peut citer par exemple MX1, PKR, OAS, IFITM, APOBEC1 et la famille des TRIM (Yan and Chen, 2012).

Les réponses IFN sont en général limitées dans le temps et dans leur intensité. Beaucoup d'études sur des modèles murins *IFNAR1*<sup>-/-</sup> ont permis de mettre en évidence le rôle protecteur de l'IFN dans des infections virales comme les virus MCMV, vesicular stomatitis virus (VSV), Semliki forest virus, vaccinia virus et LCMV et HSV1. L'IFN permet de contenir immédiatement la réplication virale de ces virus (Muller et al., 1994). Cependant, l'IFN dérivé des pDC devient moins important dans les phases plus tardives de l'infection ; en effet, d'autres cellules de l'hôte prennent le relais et deviennent à leur tour des productrices dominantes d'IFN. Les pDC sont une source essentielle d'IFN-I dans les infections systémiques lorsque le virus atteint la circulation périphérique. En effet, la présence des pDC dans les défenses antivirales induites par l'IFN-I pendant une infection locale semble être nécessaire que lorsque les autres types de défense sont inefficaces. Par exemple, dans l'infection avec NDV, les macrophages alvéolaires sont la première source d'IFN-I et s'ils sont éliminés, l'IFN-I produit par les pDC devient important.

L'IFN $\alpha/\beta$  peut aussi avoir des effets sur les réponses immunitaires des cellules de l'immunité innée et adaptative. L'IFN $\alpha/\beta$  affecte les cellules myéloïdes, les lymphocytes T et B, les cellules NK et ainsi augmente la réponse immunitaire, afin d'éliminer l'infection virale plus efficacement et d'améliorer les réponses mémoires pour les infections à venir.

### III. B. 2. Le rôle nocif de l'IFN dans les infections virales

Comme décrit précédemment, les IFN contribuent à la protection antivirale en induisant divers programmes antiviraux à base d'ISG. Cependant, il y a de plus en plus de preuves que l'IFN $\alpha/\beta$  peut aussi avoir un rôle nocif dans les infections virales, soit en induisant des effets immunosuppresseurs qui vont inhiber la réponse antivirale soit en déclenchant l'inflammation et des dommages tissulaires participant à l'exacerbation de la maladie.



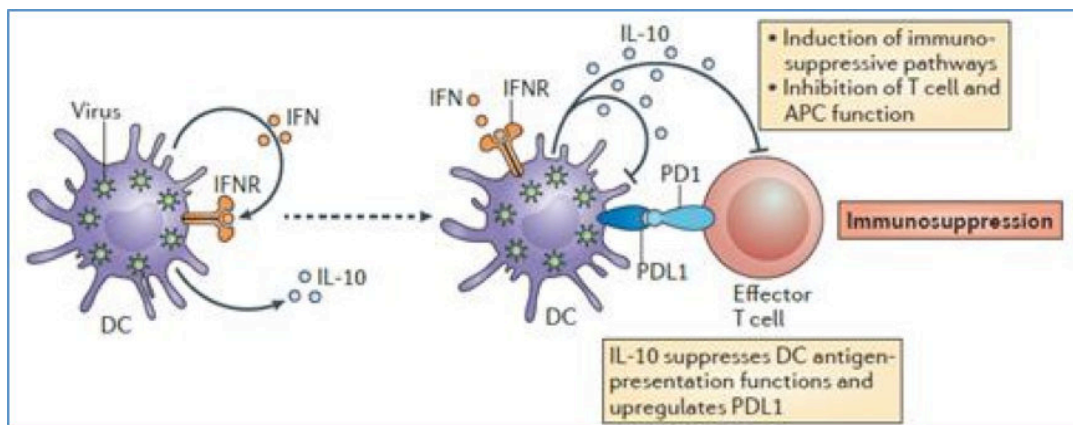
**Figure 14: L'interféron de type I pendant l'infection virale.**  
Modifié à partir de (McNab et al., 2015)

Deux études dans un modèle *in vivo* murin sur le virus LCMV ont récemment identifié des mécanismes suppresseurs impliqués dans l'effet nocif de l'IFN $\alpha/\beta$  dans les infections virales chroniques (Teijaro et al., 2013; Wilson et al., 2013). De plus, l'IFN $\alpha/\beta$  réduit la réponse des lymphocytes T en induisant les gènes immunosuppresseur comme ceux qui codent pour l'IL-10 et PDL1 (programmed cell death 1 ligand 1). En effet, les études montrent que le blocage de la voie de signalisation de l'IFN améliore le contrôle du virus LCMV par les lymphocytes T CD4+.

On a toujours considéré l'IFN-I comme un acteur essentiel dans l'inhibition de la progression de l'infection par le virus de la grippe. De façon très surprenante, les effets négatifs de l'IFN sur la progression de cette maladie virale aigüe ont été découverts très récemment. Il a été montré que les infections sévères par le virus de la grippe étaient associées avec des dommages induits par TRAIL sur les cellules épithéliales et que l'IFN $\alpha/\beta$  peut induire l'expression de TRAIL

sur les monocytes inflammatoires. De la même façon, il a été montré que l'exposition au virus de la grippe induisait l'expression de TRAIL sur les pDC *in vitro*. Ces résultats ont été validés par une étude très récente. L'équipe d'Andreas Wack a montré que les souches de souris sensibles au virus de la grippe avaient un signal l'IFN $\alpha/\beta$  plus fort et plus prolongé que les souches résistantes au virus, même dans les phases précoces de la maladie dans lesquelles il n'y avait pas de différence dans les titres viraux détectés (Davidson *et al.*, 2014; Davidson *et al.*, 2015). Les souches susceptibles sont caractérisées par un nombre élevé de pDC et des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires. Lorsque l'IFN $\alpha/\beta$  est bloqué dans ces souches, les auteurs observent une réduction de l'inflammation et des dommages des poumons résultant en une amélioration de la survie. De plus, ils ont montré que la surexpression de TRAIL induit l'IFN-I sur les monocytes et l'expression de DR5 par les cellules épithéliales était responsable de pathogénicité de la maladie. Ainsi, les niveaux excessifs de l'IFN $\alpha/\beta$  peuvent contribuer à l'immunopathologie dans l'infection sévère par le virus influenza, en induisant principalement des dommages tissulaires.

Dans une autre infection virale chronique, comme HCV, il a été montré, sur une lignée cellulaire Huh-7, que la caspase-8, TRAIL et DR5 fonctionnent ensemble afin d'augmenter l'apoptose en réponse à de l'IFN-I exogène (Shigeno *et al.*, 2003).



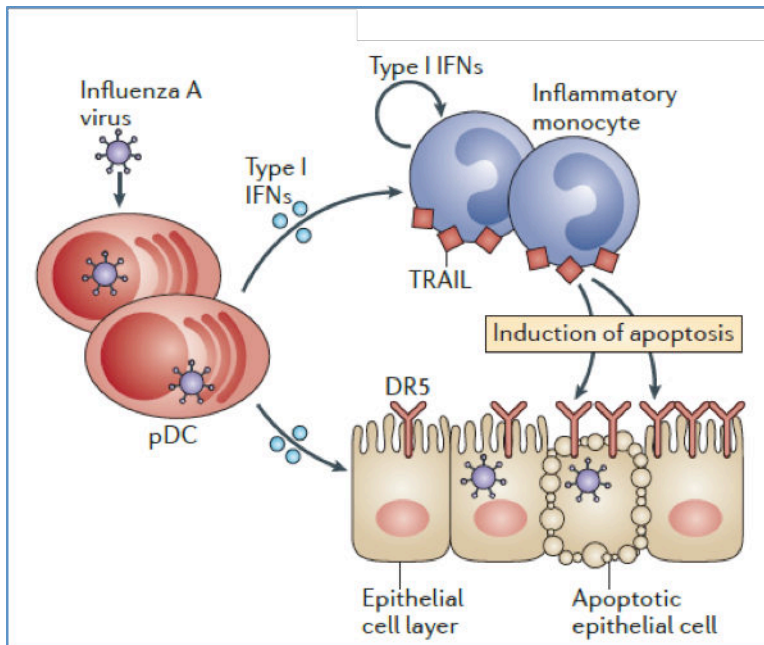
**Figure 15: L'interféron de type I persistant pendant l'infection virale chronique induit la voie de signalisation de l'immunosuppression.**

*Modifié à partir de (Ivashkiv and Donlin, 2014)*

En conclusion, l'IFN $\alpha/\beta$  module la régulation positive de l'expression du ligand pro-apoptotique TRAIL, qui, quand il est exprimé par des cellules somatiques non-hématopoïétiques, induit des dommages tissulaires. Cette même molécule quand elle est exprimée par les cellules immunitaires en réponse à l'IFN $\alpha/\beta$ , peut contribuer à l'immunosuppression par PDL1 et IL-10. Ainsi, en fonction du pathogène, de l'hôte et du contexte, l'IFN-I peut avoir des effets protecteurs dans l'infection virale mais peut aussi contribuer à l'immunosuppresseur ou à l'immunopathologie. On peut ainsi considéré qu'il n'existe qu'un court temps, lors de phase aigue de la maladie, pendant lequel l'IFN-I et les pDC sont à la fois bénéfiques

et nécessaires pour prévenir ou contrôler l'infection chronique virale et préserver le nombre et les fonctions des autres types cellulaires.

### III. B. 3. Le rôle complexe de la réponse innée dans l'infection par le VIH

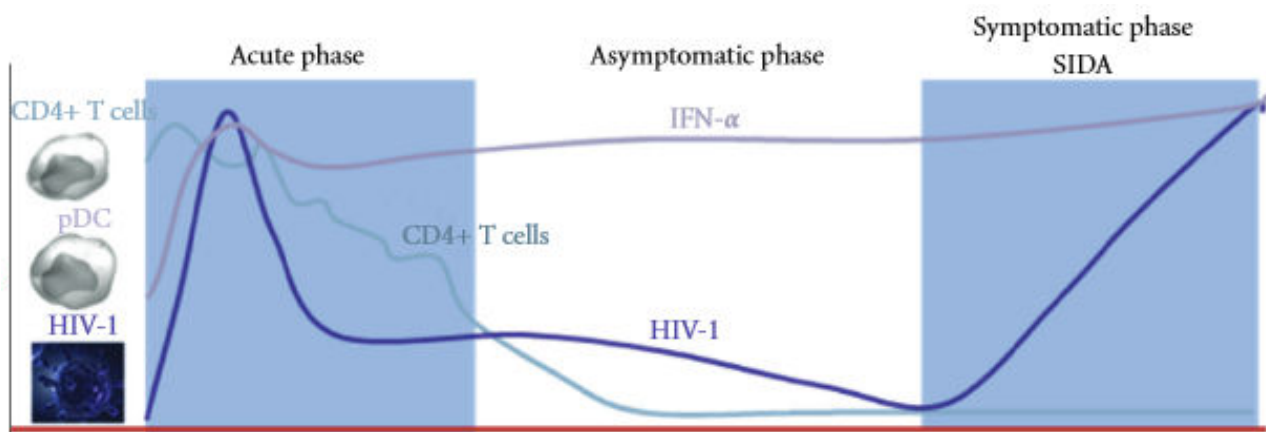


**Figure 16: L'interféron de type I pendant l'infection virale aiguë induit l'expression du ligand pro-apoptotique TRAIL.**

*Modifié à partir de (McNab et al., 2015)*

Le VIH-I est un rétrovirus du genre Lentivirus qui cause des infections persistantes chez l'Homme. Le VIH a émergé lors de la transmission inter-espèces du SIV du chimpanzé à l'Homme dans la première moitié du XXème siècle. Le VIH infecte principalement les lymphocytes T CD4+ et est responsable du SIDA caractérisé par la perte massive des lymphocytes T CD4+, une immunodéficience importante et une susceptibilité fatale aux infections opportunistes.

Le rôle des pDC dans l'infection chronique du VIH-I est très complexe car il implique l'activation et le trafficking des pDC, la production d'IFN-I et les interactions avec les lymphocytes T CD4+ (Manches et al., 2014). Même si les pDC possèdent le récepteur CD4 et les corécepteurs CXCR4 et CCR5 du VIH, il a récemment été montré qu'elles étaient très peu infectées (environ 3,5% d'infection) (Lederle et al., 2014 ; O'Brien et al., 2013). Cependant, le VIH est un très bon activateur des pDC. Les pDC peuvent aussi bien reconnaître les virus libres du VIH mais aussi les cellules infectées par le virus. Le virus va alors être endocyté dans des endosomes contenant TLR7 afin d'activer la voie de la production de l'IFN-I et par la suite amplifier cette réponse en activant la boucle autocrine et paracrine de l'IFN par les IFNAR et l'activation des ISG (Beignon et al., 2005; McKenna et al., 2005 ; O'Brien et al., 2011). En effet, le VIH se retrouve rapidement dans des endosomes précoces ce qui va avoir pour conséquence une faible expression des molécules de maturation à la surface des pDC, la sécrétion persistante de l'IFN-I et l'induction faible de la réponse par les lymphocytes T.



**Figure 17:** Les niveaux d'IFN-I, de la charge virale et des lymphocytes T CD4+ durant les différentes phases de l'infection par le VIH.

Modifié à partir de (Herbeuval et al., 2012)

Le VIH induit le déplacement des pDC vers les ganglions périphériques, ce qui a pour conséquence la diminution du nombre de pDC circulantes trouvées dans le sang de patients infectés par le VIH. Les pDC peuvent aussi s'accumuler dans la muqueuse intestinale en réponse à la surexpression du marqueur de migration intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et CD103 chez ces mêmes patients (Reeves et al., 2012). On peut remarquer que les pDC des élites contrôleurs retournent aussi vers l'intestin, suggérant que le déplacement des pDC est indépendant de la charge virale. Les pDC contribuent à la chronicité de l'infection par le VIH à cause de leur activation dérégulée et la production massive d'IFN (O'Brien et al., 2013). De plus, le VIH peut induire la voie de signalisation tolérogène de NF- $\kappa$ B et l'induction des Treg.

TRAIL et ses récepteurs de mort sont le lien entre les hauts niveaux d'IFN $\alpha/\beta$  et la mort cellulaire. Par exemple, dans une étude avec des individus infectés par le VIH, il a été montré que l'expression d'IFN $\alpha/\beta$  par les pDC et les niveaux d'expression de TRAIL et de DR5 dans les tissus d'amygdales étaient plus élevés chez les progressseurs que chez les non-progressseurs (Herbeuval et al., 2006). En effet, il a été montré qu'en plus de se fixer et d'infecter les lymphocytes T CD4+, le VIH induisait l'expression de DR5 à leur surface, les rendant susceptibles à l'apoptose. Il est maintenant établi que le VIH-I est un virus peu infectieux (en moyenne un lymphocyte T CD4+ est infecté sur 1000 chez les patients) (Schnittman et al., 1989), or ce pourcentage de lymphocytes T CD4+ infectés par le virus est trop faible pour expliquer la déplétion massive de ces cellules. Il a ainsi été proposé un modèle dans lequel les lymphocytes T CD4+ non infectés étaient aussi susceptibles à l'apoptose induite par TRAIL. En effet, Herbeuval et al., a montré que le virus inactivé par l'aldrithiol-2, HIV-I<sub>MN</sub>AT-2 (aldrithiol-2) induisait l'expression de DR5 à la surface des lymphocytes T CD4+ mais aussi TRAIL à la surface des pDC induisant la mort massive des lymphocytes T CD4+ (Herbeuval et al., 2005a; Herbeuval et al., 2005b). Similairement, une étude *in vitro* démontre que le VIH est responsable de la surexpression de TRAIL induite par l'IFN sur les

pDC ; ces IKpDC vont alors induire la mort des lymphocytes T CD4+ mais aussi des lymphocytes B mémoires (van Grevenynghe et al., 2012).

La comparaison des conséquences de l'infection du virus immunodéficience simienne (SIV) chez les espèces de primates qui développent des syndromes de type SIDA et chez celles qui n'ont pas de symptômes indique clairement le rôle de l'IFN-I ; une forte réponse d'IFN $\alpha/\beta$  est présente pendant l'infection pathogène chez les macaques alors que les primates ne présentant pas de progression ont des réponses IFN faibles (Diop et al., 2008; Harris et al., 2010; Jacquelin et al., 2009). Des résultats similaires ont été trouvés chez des patients infectés avec le VIH ; les progressseurs virémiques rapides ont une signature d'IFN $\alpha/\beta$  plus fortes que les non-progressseurs. Ces études suggèrent le lien entre les niveaux constants d'IFN $\alpha/\beta$  et la progression de la maladie. Cependant, les mécanismes impliqués sont peu clairs. L'une des hypothèses suggèrent que l'inflammation chronique induite par l'IFN et l'activation du système immunitaire facilite le recrutement de la cible lymphocyte T CD4+ et ainsi la dispersion du virus VIH. Une autre hypothèse suggère que l'effet immunosuppresseur de l'IFN $\alpha/\beta$  réduit l'expansion clonale des lymphocytes T (à travers la voie de signalisation de STAT1) et la capacité des lymphocytes T à restreindre le VIH. Les effets négatifs de l'IFN $\alpha/\beta$  sur la prolifération des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques dépendent probablement du temps d'exposition de l'IFN. L'exposition avant la stimulation antigénique est suppressive alors qu'une stimulation simultanée est stimulatrice.

L'équipe de D. Doueck a par ailleurs montré dans un modèle de macaques infectés avec le SIV, que l'IFN-I avait un rôle très important dans la phase aigüe. En effet, l'IFN-I induit les ISG dans le but de bloquer la réplication virale et de limiter la progression initiale de la maladie. Les IFNAR sont nécessaires afin de réduire la taille du réservoir et de diminuer la déplétion des lymphocytes T CD4+, et par conséquent limiter la progression vers la phase SIDA. D'autre part, l'administration initiale d'IFN $\alpha$ 2a permet la surexpression des gènes antiviraux et prévient les infections systémiques. Cependant, un traitement prolongé à l'IFN $\alpha$ 2a induit une désensibilisation à l'IFN (diminution des gènes antiviraux), une augmentation des réservoirs du VIH et une plus grande perte des CD4+ (Sandler et al., 2014). Cette étude indique que le timing de la réponse innée induite par l'IFN-I joue un rôle primordial dans la progression de la maladie, ce qui est probablement le cas pour la plupart des infections virales.

Il a été montré récemment dans un modèle de souris humanisées que la déplétion des pDC avant et pendant l'infection chronique de l'infection par VIH-I diminue drastiquement la production de l'IFN-I et la mort des lymphocytes T CD4+ mais que la réplication virale est augmentée (Li et al., 2014).

### III. C. LES INFECTIONS BACTÉRIENNES

#### III. C. I. L'IFN-I et les pDC dans les infections bactériennes

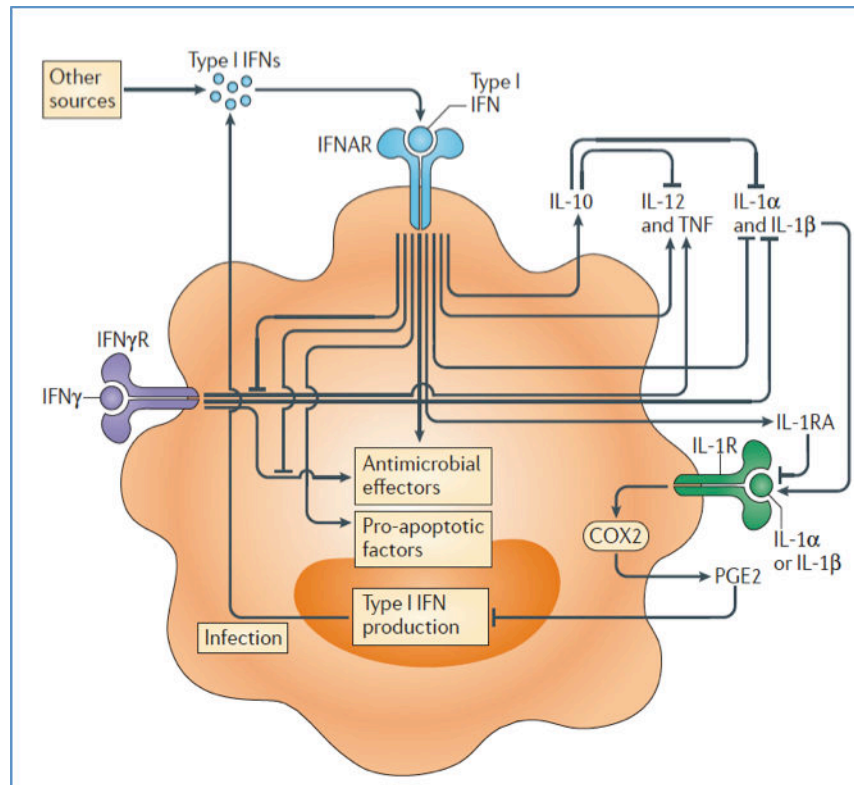
Pendant longtemps, les pDC étaient considérées comme des médiateurs spécifiques de la réponse antivirale ; cependant plusieurs études ont montré leur implication dans les infections bactériennes (Bogdan *et al.*, 2004). Ces études se focalisent principalement sur les bactéries intracellulaires car l'induction de l'IFN-I par des bactéries extracellulaires est plus complexe et n'a été observée qu'avec *Escherichia Coli* et *S. Aureus* (Michea *et al.*, 2013; Parcina *et al.*, 2013).

A la surface des cellules le récepteur TLR4 reconnaît les LPS des bactéries et induit une forte réponse IFN-I par la protéine adaptatrice TRIF. Cependant, dans les endosomes, le TLR9 présent dans les pDC peut aussi reconnaître l'ADN des bactéries afin d'engendrer la réponse IFN-I (Mancuso *et al.*, 2009). En effet, bien que TLR9 soit à ce jour étudié dans son rôle de senseur de l'ADN viral, ce récepteur avait tout d'abord été décrit en tant que senseur de l'ADN bactérien non méthylé possédant un grand nombre de motifs CpG. L'hôte peut aussi utiliser TLR7 présent dans les pDC pour reconnaître l'ARN bactérien relargué dans les endolysosomes par des bactéries phagosomales (Eberle *et al.*, 2009; Petzke *et al.*, 2009). D'autre part, il a été montré que les pDC formaient de façon constitutive et par l'intermédiaire de ATG5 (Autophagy-Related Gene 5) des autophagosomes qui sont clairement impliqués dans le transport des acides nucléiques agonistes présents dans le cytoplasme vers les endosomaux comportant des TLR. L'IFN $\gamma$  a été le premier IFN à être considéré comme antibactérien. En effet, il a pour fonction principale d'induire un état microbicide sur les macrophages. Cependant, il a par la suite été montré que tout type d'IFN avait un rôle anti-infectieux contre tout type de pathogènes.

De la même façon que lors des infections virales, divers gènes qui codent pour des cytokines, des chimiokines, des effecteurs antibactériens, des molécules anti- et pro-apoptotiques sont induits en réponse à une stimulation bactérienne. Les mécanismes dépendants de l'IFN qui permettent de défendre les cellules de l'hôte reposent sur des phénomènes oxydatifs, nitrosatifs et protonatifs, mais aussi sur la dépravation des nutriments et sur les activités de lyse membranaire. En effet, l'IFN induit la production de gaz cytotoxiques comme les ROS (Reactive Oxygen Species) et les RNS (Reactive Nitrogen Species) qui ciblent l'ADN bactérien mais aussi des cytokines comme IDO et iNOS (Inducible nitric oxide synthase), ce qui leur confère une activité antimicrobienne (Nathan and Shiloh, 2000). Les traitements à l'IFN dans certains cas d'infections bactériennes sont donc préconisés afin d'induire la protection contre notamment les différentes infections par *Chlamydia*, *Legionella pneumophila*, *Bacillus anthracis*, le groupe B des *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*... L'IFN $\alpha/\beta$  peut restreindre la croissance



bactérienne, induire la mort bactérienne intracellulaire mais aussi prévenir de l'invasion cellulaire par des bactéries de l'intestin comme *Shigella flexneri* et *Salmonella enterica* (Karupiah et al., 1993).



**Figure 18: Mécanismes d'action de l'interféron pendant les infections bactériennes.**  
Modifié à partir de (McNab et al., 2015)

Cependant, comme dans de nombreuses pathologies, l'IFN $\alpha/\beta$  peut aussi avoir un rôle délétère dans les infections bactériennes. Il existe notamment deux infections bactériennes dans lesquelles l'IFN-I est nocif : *Listeria Monocytogenes* et *Mycobacterium Tuberculosis*, deux bactéries intracellulaires qui nécessitent une large réponse immunitaire de l'hôte pour être contrôlées (Manca et al., 2001; Manca et al., 2005). Dans le cas de *L. Monocytogenes*, l'IFN induit une très forte mort cellulaire en induisant l'expression de gènes pro-apoptotique comme TRAIL et p53. Il a été montré que l'apoptose induite dépend de STAT1 mais est indépendante d'iNOS et de PKR. Dans le cas de *M. Tuberculosis* le rôle néfaste de l'IFN est plus controversé, car le contexte génétique de l'hôte est important. Cependant, il a tout de même été montré que la surexpression de l'IFN $\alpha/\beta$  est clairement responsable de l'augmentation de la sévérité de l'infection. En effet, l'IFN $\alpha/\beta$  inhibe la production de certaines cytokines cruciales aux défenses de l'hôte contre ces infections, comme l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ , la production d'iNOS, tout en augmentant les niveaux de cytokines tolérogènes comme IL-10 et IL-1R (McNab et al., 2015).



### III. C. 2. TRAIL dans les infections bactériennes

La voie de signalisation des membres de la famille du TNF, comme TRAIL/DR est primordiale afin d'engendrer une réponse efficace de l'hôte contre des infections bactériennes. En effet, l'interaction entre le ligand pro-apoptotique et son récepteur de mort diminue la susceptibilité à diverses infections virales secondaires, la mort associée à ces infections et la résistance aux chocs septiques induits par les LPS. Ces résultats confirment le rôle protecteur crucial du couple TRAIL/DR5 dans les infections bactériennes. Cependant, certaines thérapies anti-TNF ont considérablement augmenté le risque de développement de certaines maladies comme la tuberculose.

## **III. D. LES ALLERGIES**

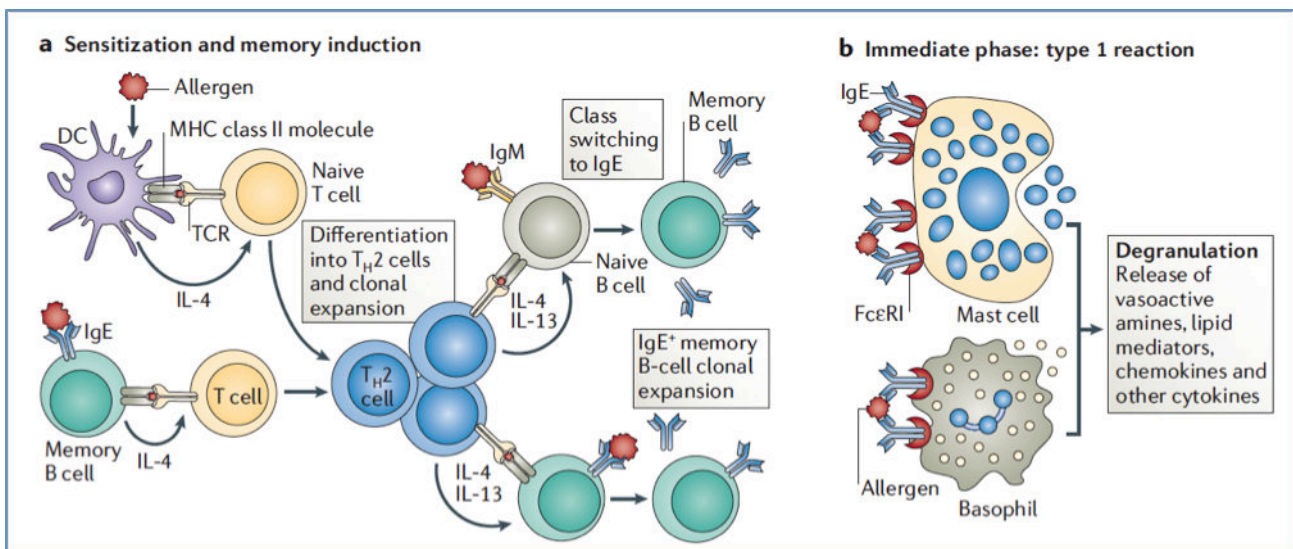
### III. D. I. Sensibilisation due aux allergies

L'asthme allergique affecte plus de 300 millions de personnes dans le monde et est responsable de 250 000 morts par an. En 2009, on estimait que 10% des adultes et 8% des enfants aux États-Unis étaient diagnostiqués avec de l'asthme. Même si l'asthme est une maladie hétérogène avec de diverses conséquences cliniques, 70% des individus qui souffrent d'asthme ont développé ces maladies à cause d'allergènes (Revue par (Gonzales-van Horn and Farrar, 2015)).

Les cellules épithéliales de la couche supérieure des voies respiratoires sont les premières cellules à être en contact direct avec les allergènes. En réponse à cette stimulation, ces cellules produisent du TSLP (un suppresseur de la cytokine pro-inflammatoire IL-12) et les cytokines IL-33 (nécessaire à la sécrétion d'IL-13 par les mastocytes) et l'IL-25 (Junttila *et al.*, 2013). Les allergènes peuvent aussi directement activer les cellules en se fixant à des anticorps spécifiques, les IgE qui sont eux fixés sur leur récepteur de haute affinité, les FcεR (=IgεR) exprimés sur les granulocytes, les monocytes, les macrophages, les DC (et notamment les pDC), les plaquettes et les lymphocytes B (Novak *et al.*, 2001). Dans les différents types cellulaires le cross-link des IgεR induits par les allergènes induit la production de cytokines. Ainsi, les mastocytes et les basophiles possèdent des granules perforées qui relarguent notamment de l'histamine, diverses protéases et des médiateurs lipidiques. Les APC, notamment les cDC et les pDC, présentent les allergènes traités dans le contexte du CMH de classe I aux lymphocytes T naïfs dans les ganglions et la rate. Cette présentation mène à l'activation des Th<sub>2</sub>, leur migration vers les sites où l'allergène est présent et la sécrétion de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13. D'autre part, il a été montré que plus il y avait de

IgE, plus le FcεRI est exprimé par les mastocytes, basophiles et cellules dendritiques, ce qui a pour conséquence de renforcer le phénotype allergique (Kuhl and Hanania, 2012).

Le développement de maladies atopiques est un phénomène relativement récent qui semble corrélér avec l'industrialisation et l'augmentation des conditions sanitaires (Strachan, 1989). En effet, une étude a montré que les enfants sensibilisés à différents allergènes avant leur un an développaient moins d'asthme que ceux n'ayant pas subit cette sensibilisation. Les premiers mois de vie sont donc essentiels pour la mise en place de la tolérance du système immunitaire envers les allergènes (Lynch *et al.*, 2014).



**Figure 19 : Mécanismes de la réaction allergique**

*Modifié à partir de (Larche et al., 2006)*

### III. D. 2. Antagonisme entre les réponses allergiques et antivirales

Les poumons sont l'une des barrières muqueuses en constante interaction avec l'environnement et les microorganismes présents. Les pathogènes viraux se fixent aux marqueurs de surface des cellules épithéliales afin de les infecter. D'autre part, l'invasion des pathogènes active le système immunitaire. De façon intéressante, les individus asthmatiques semblent présenter des réponses altérées contre les infections virales (Rowe and Gill, 2015). En effet, les cellules bronchiales de patients asthmatiques produisent moins d'IFNβ. Ces individus sont plus prédisposés aux réponses allergiques qui l'emportent sur les réponses antivirales (Uller *et al.*, 2010). 80% des exacerbations asthmatiques sont associées aux infections virales respiratoires ; les individus atopiques sont donc plus susceptibles à ce type d'infections. On peut remarquer qu'une première infection virale modifie la réponse immunitaire envers une infection bactérienne concurrente ; en effet, il existe une corrélation positive entre les infections virales et les infections bactériennes au niveau pulmonaire. Par exemple, les souris infectées par la grippe produisent

moins d'IFN $\gamma$  pulmonaire en réponse à une infection pneumococcale (Sun and Metzger, 2008). Ces observations corrélaient avec une étude dans laquelle les individus ayant une infection au rhinovirus et sont traités par de l'IFN $\alpha$ 2b intranasal, nécessitent des traitements antibiotiques plus fréquemment pour des secondes infections.

De la même façon que la voie des TLR dans les pDC induit l'expression de l'IFN $\alpha/\beta$  et de l'IFN $\lambda$ , les cellules épithéliales produisent aussi de l'IFN $\lambda$ . Le mécanisme par lequel les maladies allergiques altèrent les réponses immunitaires n'est pas encore défini. Cependant, l'hypothèse que le cross-link des IgER par les IgE inhibe la réponse antivirale semble la plus plausible. En effet, les pDC des patients atopiques répondent moins bien à une stimulation virale que celles d'un donneur sain (Gill *et al.*, 2010). Il existe aussi une corrélation négative entre les niveaux d'IgE dans le sérum et la quantité d'IFN $\alpha$  et il a été montré que les pDC de patients atopiques présentent une expression supérieure de l'IgER. De la même façon que pour les pDC, les cellules épithéliales bronchiales d'un patient asthmatique produisent moins d'IFN $\lambda$  après une infection virale (Contoli *et al.*, 2006). Cependant, les PBMC du sang de patients asthmatiques produisent des taux normaux de cytokines, ce qui tend à valider que les différences observées dans la réponse antivirale est uniquement locale et dépend de l'environnement et non à une déficience génétique de la réponse immunitaire du patient.

En plus du cross-link par les IgER, d'autres signaux peuvent jouer un rôle dans la voie de régulation des pDC. En effet, Mazzoni *et al.*, ont montré qu'en présence d'histamine les pDC n'étaient plus capables de sécréter de l'IFN-I. Cette équipe, ainsi qu'une autre qui travaille sur le rôle de l'histamine dans le psoriasis, suggère que l'inhibition de l'activation des pDC s'effectue par l'interaction de l'histamine avec son récepteur (HR) (Gschwandtner *et al.*, 2011; Mazzoni *et al.*, 2003). D'autres études montrent que les récepteurs comme les lectines de type C pouvaient moduler la réponse des DC aux allergènes (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009).

Ainsi, la multitude de signaux, incluant les cytokines (IL-33 et TSLP), l'activation des IgER et des récepteurs lectines de type II, contribue probablement en synergie à l'inhibition de l'IFN $\alpha/\beta$  et de l'IFN $\lambda$ .

### **III. E. LES TUMEURS**

#### **III. E. I. Les pDC et l'IFN dans l'immuno-surveillance tumorale**

Le recrutement des pDC vers les tumeurs est souvent associé avec un mauvais pronostic. En effet, les pDC infiltrées dans les tumeurs ont plutôt tendance à être tolérogène qu'immunogène.

Les résultats expérimentaux suggèrent fortement l'existence d'un processus selon lequel le système immunitaire protège l'hôte contre l'oncogenèse et contrôle les caractéristiques immunologiques des tumeurs en développement. Ce phénomène d'immuno-surveillance s'appelle « l'immunoediting » et consiste en trois phases (Schreiber *et al.*, 2011): (1) l'élimination de cellules malignes par le système immunitaires ; (2) l'établissement d'un équilibre entre des cellules malignes génétiquement instables et les cellules du système immunitaire, ce qui reflète la pression de l'immunoediting imposé par le système immunitaire sur les cellules cancéreuses ; (3) la fuite des variants cellulaires néoplastiques avec la réduction de l'immunogénéité, ce qui va induire de nouveaux néoplasmes. L'IFN-I intervient dans ces trois phases (Dunn *et al.*, 2005).

Des pDC non-stimulées, mais aussi dans certains cas lorsqu'elles sont activées, induisent une réponse des cellules T régulatrices (Treg) en présence deIDO ou de ICOSL. L'accumulation de cellules exprimant IDO dans les ganglions drainants a été associée avec de très mauvaises conséquences cliniques pour les patients avec des tumeurs malignes, en particulier ceux avec un carcinome au sein. En effet, le nombre élevé de pDC infiltrantes chez des patients avec un cancer du sein invasif mais non métastatique est corrélé avec un risque accru de dissémination tumorale, de rechute et un temps de survie réduit (Treilleux *et al.*, 2004). Les pDC contribuent donc à la progression du cancer du sein. Les pDC dans les tumeurs du sein sont de très faibles productrices d'IFN-I et favorise l'expansion des Treg. Les mécanismes qui induisent la suppression de la production d'IFN-I et inhibe la capacité immunogénique des pDC infiltrantes font appel au facteur de croissance TGF $\beta$  (tumour cell-derived transforming growth factor- $\beta$ ), au facteur de nécrose TNF (tumour necrosis factor) mais aussi au facteur soluble sécrété par les cellules tumorales, PGE<sub>2</sub>. TGF $\beta$  et TNF inhibent tout deux la sécrétion de l'IFN par les pDC en induisant la diminution de l'expression de TLR7/9, d'IRF7 (Bidwell *et al.*, 2012) mais aussi du marqueur de migration CCR7. L'expression d'ICOSL sur les pDC semble aussi corrélée avec la progression du cancer du sein en induisant l'augmentation du nombre de lymphocytes Treg immunosuppresseur et producteur d'IL-10 (Aspord *et al.*, 2013).

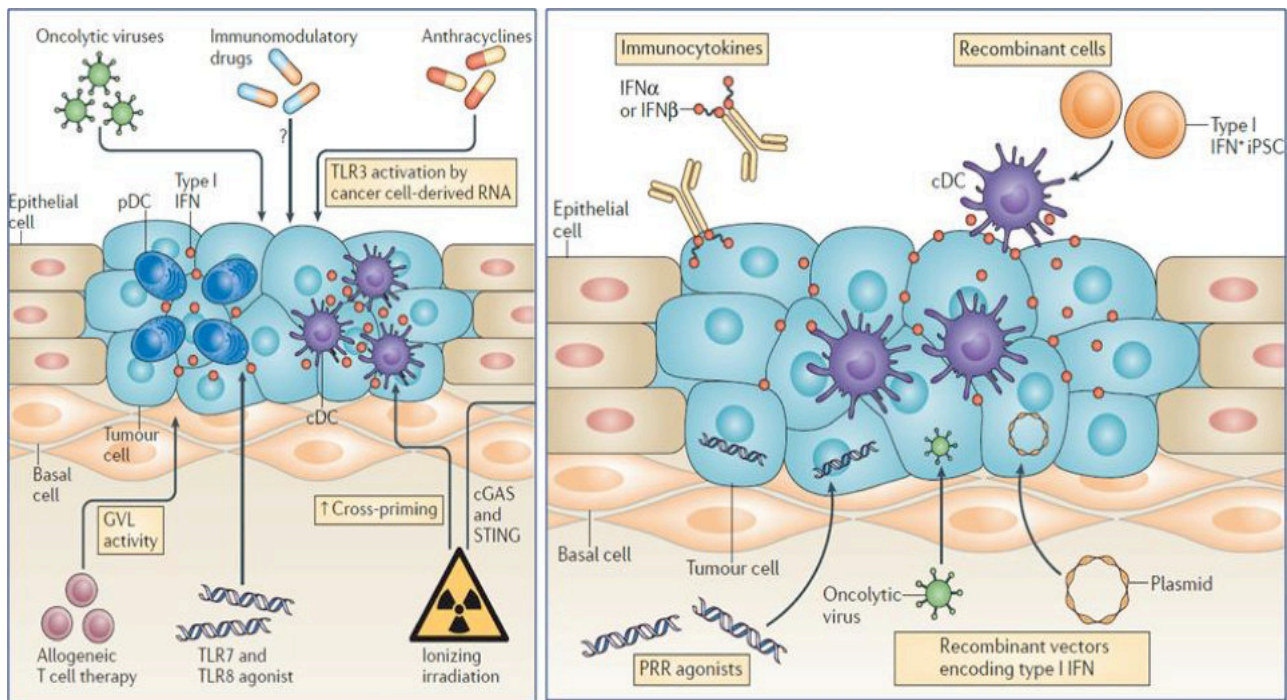
Le recrutement des pDC vers les tumeurs des ovaires s'effectue par CXCL12/SDF-1 et est associé avec une réponse des lymphocytes T altérée mais aussi la production de TNF $\alpha$  et de l'IL-8, favorables à l'angiogenèse (Curiel *et al.*, 2004) ; ce qui résulte en un mauvais pronostic pour le patient. A l'inverse des pDC du sang ou celles dans les ascites, les pDC associées au cancer des ovaires produisent beaucoup moins d'IFN-I, de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines en réponse à une stimulation des TLR et peuvent induire la production d'IL-10 par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs allogéniques, ce qui suggère qu'elles ont un rôle crucial dans l'induction de la tolérance immunitaire et dans la progression du cancer des ovaires.

Les pDC humaines peuvent aussi contribuer à la progression des cancers en induisant la production et le relargage de la molécule pro-apoptotique granzyme B, ce qui va supprimer la prolifération des lymphocytes T. L'activation des pDC par des agonistes de TLR et CD40L régule négativement l'expression du granzyme B et la capacité des pDC à supprimer les lymphocytes T. A l'inverse des NK, les pDC ne relargue pas de perforine et sont donc incapables de tuer les tumeurs cibles en relargant des granules lytiques.

Plusieurs preuves montrent que divers cancers expriment des ligands reconnus par les récepteurs régulateurs des pDC, suggérant que les tumeurs développent aussi des mécanismes afin d'échapper aux réponses antivirales des pDC. BST-2, le ligand d'ILT-7, est exprimé par un grand nombre de tumeurs (Blasius *et al.*, 2006b). En effet, l'interaction de BST-2 et ILT-7 supprime la production de tous les sous-types d'IFN-I et de TNF $\alpha$  après activation des TLR7/9 mais n'affecte pas les marqueurs de surface de maturation CD80 et CD86. Certaines cellules cancéreuses comme les mélanomes, les carcinomes rénaux et les tumeurs du poumon expriment constitutivement BST2 alors que d'autres tumeurs ont besoin d'une stimulation par des cytokines produites par les cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral pour exprimer cette molécule.

Lorsque les pDC sont stimulées de façon appropriée, elles peuvent aussi promouvoir des réponses anti-tumorales immunogéniques. L'injection de pDC activées avec des peptides associés aux tumeurs à des patients avec des mélanomes métastatiques mène à des réponses favorables des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Ces résultats indiquent que la stratégie vaccinale utilisant des pDC activées peut être une stratégie thérapeutique attractive afin de surmonter la tolérance immunitaire dans certains types de cancers (Tel *et al.*, 2013). Dans un modèle murin de tumeur mammaire, l'administration de ligand de TLR7 a résulté en l'activation de pDC associées à la tumeur qui ont alors un fort potentiel de cellules anti-tumorales. Dans le modèle murin de mélanome B16, les pDC stimulées par TLR expriment TRAIL et le granzyme B, ce qui va activer les cellules NK et donc induire la mort de la tumeur. Ainsi le développement d'un vaccin qui active les pDC et qui leur confère à la fois la capacité de produire de l'IFN, de présenter l'antigène et de lyser les cellules cibles a fait ses preuves (Tel *et al.*, 2012).

### III. E. 2. L'IFN-I et les thérapies anticancéreuses



**Figure 20: Contribution de l'IFN-I dans les thérapies anticancéreuses dans des lésions malignes.**

Modifié à partir de (Zitvogel et al., 2015)

De plus en plus de preuves indiquent que le succès des chimiothérapies conventionnelles, que ce soit agents anticancéreux, la radiothérapie ou l'immunothérapie, repose sur la voie de signalisation de l'IFN de type I. En effet, des thérapies immunogènes, comme l'utilisation des anthracyclines, induit l'activation de TLR3 par des ARN dérivés de cellules cancéreuses dans les cellules malignes ce qui résulte en la sécrétion d'IFN de type I. L'IFN-I active ensuite une boucle autocrine ou paracrine dépendante des récepteurs à l'IFN, IFNAR. Ainsi, un grand nombre d'ISG va être induit comme CXCL10, un chemotractant pour les cellules immunitaires, et le facteur antiviral MXI (Sistigu et al., 2014). Il a aussi montré sur la souris avec des mélanomes B16 ou des carcinomes colorectaux, que la radiothérapie pouvait augmenter la cross-présentation des pDC infiltrées exprimant IFNARI. La signalisation de l'IFN-I est aussi essentielle dans les immunothérapies. L'imiquimod, un ligand synthétique de TLR7 et TLR8, est appliqué dans les traitements des cancers de la peau car il induit le recrutement des pDC vers les tumeurs. Ces pDC produisent de l'IFN-I dépendamment de TLR7, ce qui active la boucle autocrine et tue les cellules tumorales avec les molécules cytotoxiques produites, comme TRAIL.

Même si la production d'IFN-I a été considérée pendant longtemps comme un obstacle dans la virothérapie anticancéreuse, en raison du fait que l'IFN bloque la réplication des virus, plusieurs preuves tendent à suggérer que l'IFN-I contribue activement à l'induction de la réponse immunitaire spécifique des antigènes associés aux tumeurs (TAA). En effet, des injections

intratumorales du virus oncolytique Newcastle disease peut éradiquer les mélanomes B16 grâce aux réponses immunitaires qui nécessitent les CTL, les cellules NK et les IFNAR1. De façon similaire, l'administration locale d'un variant codant pour l'IL-12 du virus Semliki virus induit l'activation des CTL spécifique des tumeurs lorsque l'hôte exprime les IFNAR1.

Dans les années 1980, IFN $\alpha$ 2a et IFN $\alpha$ 2b ont largement été utilisés dans le traitement des néoplasmes ; avec le temps ces thérapies ont été remplacées par des thérapies comparativement plus efficaces. A l'heure actuelle plus d'une centaine d'études cliniques sur des patients affectées par une large gamme de tumeurs solides impliquent l'administration d'IFN-I.

### III. E. 3. Controverse autour de l'utilisation de l'IFN-I en thérapie

L'administration systématique d'IFN-I peut avoir des effets immunosuppresseurs paradoxaux qui s'accompagnent par diverses conséquences majeures comme la fatigue, l'anorexie, l'hépatotoxicité, des symptômes similaires à ceux de la grippe et une dépression sévère. Pour toutes ces raisons, il est indispensable d'adresser spécifiquement l'IFN-I au microenvironnement tumoral (Lotrich, 2009). L'IFN-I peut ainsi être conjugué ou fusionné avec des anticorps monoclonaux appelés des immunocytokines.

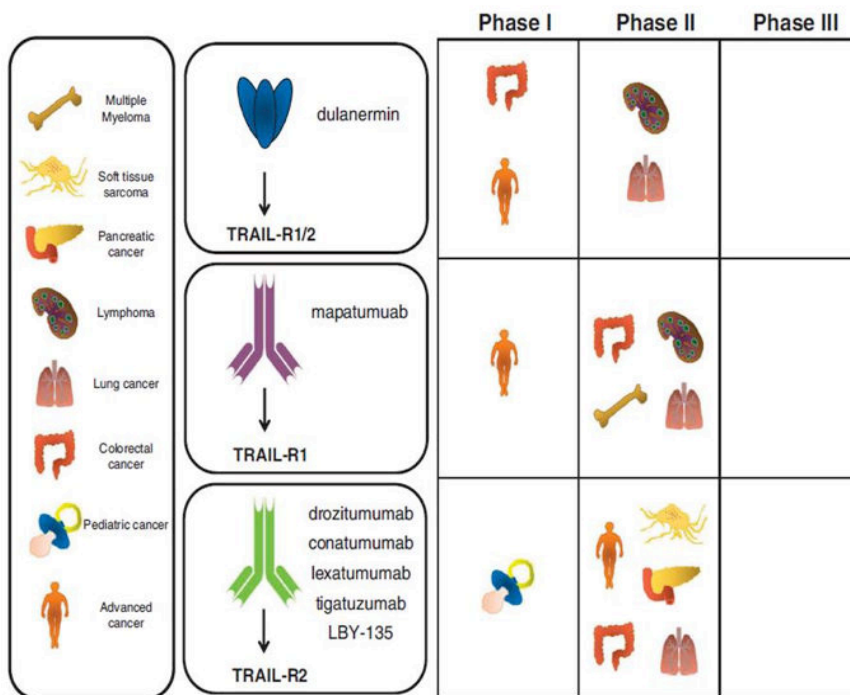
Une autre possibilité pour induire la production d'IFN-I au sein même de lésions néoplastiques est d'activer spécifiquement les PRR. Dans les cellules cancéreuses, RIG-I peut être stimulés par des espèces 5'-triphosphate d'ARN (ppp-RNA), résultant en l'initiation de la mort cellulaire, ainsi qu'en la production d'IFN-I et d'autres facteurs qui activent le système immunitaire. Ainsi, l'administration de ppp-RNA mime l'infection virale et induit les réponses immunitaires pour contrebalancer l'immunosuppression des tumeurs (Yoneyama and Fujita, 2009).

Des études cherchent à générer de nouveaux ODN CpG multimériques comme des « nanoring » qui stimulent la production d'IFN-I par les pDC et provoquent de puissantes réponses immunitaires anticancéreuses (Lesinski et al., 2003).

### III. E. 4. TRAIL en cancérologie

L'importance du contrôle de la croissance tumorale par le système immunitaire est maintenant très bien établie. La molécule centrale qui permet de détecter les dommages cellulaires et d'induire l'apoptose intrinsèque est la protéine p53. La plupart des radio- et chimiothérapies conventionnelles induisent des dommages à l'ADN ce qui active la voie de l'apoptose intrinsèque dépendante de p53. Cependant, l'inactivation fonctionnelle de p53, soit par mutation soit par la perte de son expression, est l'un des phénomènes génétiques les plus communs dans les cancers. Ainsi, la plupart des cellules cancéreuses sont de primes abords résistants ou deviennent

résistantes à ces thérapies conventionnelles. Ainsi, la stimulation de la voie extrinsèque de l'apoptose est probablement plus efficace que les thérapies conventionnelles, dans les cancers avec des mutations dans p53 (Lowe et al., 1994; Olivier et al., 2010)



**Figure 21: La voie de TRAIL/DR5 dans les essais cliniques.**  
 Modifié à partir de (Lemke et al., 2014)

Depuis que TRAIL est connu pour induire la mort spécifique des cellules cancéreuses et non des cellules normales (à l'inverse de Fas/FasL), les récepteurs de TRAIL et les ligands de TRAIL sont des cibles intéressantes dans des thérapies anticancéreuses. TRAIL supprime la croissance des tumeurs de façon expérimentale mais son rôle dans les tumeurs autochtones reste à être mieux caractérisé. Il existe ainsi deux types de thérapie à base de TRAIL, nommées TRA (TRAIL-receptor agonists) : l'une utilise du TRAIL recombinant et l'autre des anticorps agonistes spécifiques de DR5 et DR4. De plus, il a été montré que TRAIL recombinant et les anticorps contre les récepteurs de TRAIL (Debatin and Kramer, 2004) sont sans conséquence à très haute dose. L'utilisation de TRAIL recombinant à l'avantage de cibler à la fois DR5 et DR4, ce qui peut résulter à un signal de mort plus fort qu'avec un agoniste spécifique d'un seul des récepteurs. Malheureusement, plusieurs études cliniques qui utilisent ces médicaments comme des agents uniques inducteurs de la mort des cellules tumorales ont échoué à reproduire les résultats prometteurs obtenus dans les modèles animaux. Ainsi, plusieurs études précliniques examinent des multi-thérapies à base de TRAIL pour maximiser l'activité anti-tumorale. Les chimiothérapies conventionnelles composées d'agents endommageant l'ADN et la radiothérapie induisent les récepteurs de TRAIL, ce qui suggère l'utilisation synergique de ces thérapies avec des traitements ciblant TRAIL.



Cependant, il existe une mise en garde majeure à prendre en compte avec des traitements à base de TRAIL ; en effet, les cellules humaines possèdent à la fois les récepteurs de mort agonistes (DR5 et DR4) mais aussi les récepteurs leurres antagonistes (DcR1 et DcR2), ainsi TRAIL pourrait avoir un rôle pro-apoptotique ou anti-apoptotique. Cependant, chaque cancer a ses propres propriétés, et on sait que, par exemple, les cancers du colon et du sein expriment plutôt DR5 pour induire l'apoptose alors que les malignités lymphoïdes et les cancers pancréatiques utilisent DR4. Ainsi, il est important de connaître le phénotype de chaque cancer afin d'appliquer la bonne thérapie. De plus, TRAIL peut induire dans certains cancers NF- $\kappa$ B, favorisant la survie cellulaire plutôt que la mort cellulaire (Debatin and Krammer, 2004). D'autre part, le TRAIL recombinant a une durée de vie de quelques heures comparé aux anticorps qui ont plutôt une durée de vie qui peut aller jusqu'à la semaine. Ainsi, le contexte cellulaire peut expliquer le manque d'efficacité observé dans les études récentes utilisant TRAIL en thérapie.

L'expression croissante de c-FLIP a été fréquemment trouvée dans un grand nombre de malignités comme les mélanomes, les carcinomes hépatocytaires, les carcinomes pulmonaires et les cancers du colon, de la prostate et de l'endomètre. Ainsi, la surexpression de c-FLIP est associée à la progression de la maladie et un pronostic faible dans ces différentes maladies. L'expression de c-FLIP est régulée au niveau transcriptionnel par une variété de facteurs de transcription notamment par NF- $\kappa$ B. Ainsi, diminuer l'expression de c-FLIP semble être une stratégie thérapeutique intéressante comme il a été montré que la surexpression de c-FLIP<sub>L</sub> protège les cellules cancéreuses de l'apoptose induite par TRAIL dans les différentes thérapies conventionnelles (Bagnoli *et al.*, 2010; Day and Safa, 2009). Ainsi, l'utilisation de siRNA (small-interfering RNA) qui cible c-FLIP en inhibant sa production protège les cellules tumorales aux agents anticancéreux. Le siRNA c-FLIP induit aussi une apoptose spontanée d'une variété de cellules cancéreuses, validant leur rôle prometteur d'agents thérapeutiques (Day and Safa, 2009). Cependant, les obstacles concernant l'efficacité et la sécurité du mode d'administration des thérapies à base de siRNA nécessitent d'être étudiés.

### **III. F. LES MALADIES AUTO-IMMUNES**

#### **III. F. I. Reconnaissance de l'ADN du soi par les pDC**

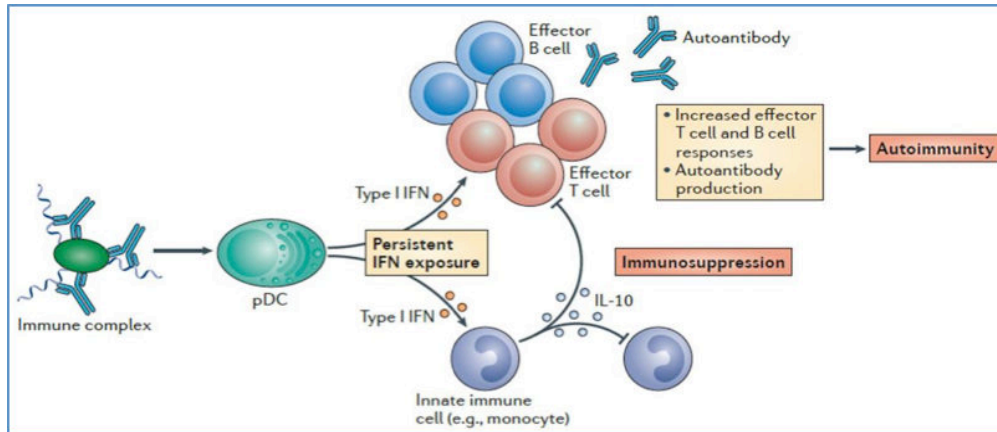
Les barrières qui empêchent les pDC de reconnaître l'ADN du soi ne sont pas infaillibles, et des réponses immunitaires contre de l'ADN du soi ont lieu dans les maladies auto-immunes (revue par (Gilliet *et al.*, 2008)).

Plusieurs facteurs de l'hôte sont impliqués dans la conversion de l'ADN du soi en molécules activatrices des pDC : le peptide antimicrobien LL-37 (connu aussi sous le nom de CAMP), les auto-anticorps, et la protéine HMGB1. LL-37 est un peptide antimicrobien endogène qui est produit par les kératinocytes et les neutrophiles dans une peau lésée et est surexprimé dans des peaux psoriatiques (Lande *et al.*, 2007). Un lien direct entre LL-37 et l'activation des pDC dans le psoriasis a récemment été établi (Lande *et al.*, 2007) : grâce à ses uniques propriétés cationiques et d' $\alpha$ -hélices, LL-37 se fixe aux fragments de l'ADN du soi relargués par les cellules mortes, ce qui forme de larges agrégats qui sont résistantes à la dégradation des nucléases extracellulaires. De plus, le complexe LL-37-ADN du soi peut entrer dans les pDC selon un processus qui implique une endocytose dépendante des lipides-rafts et des protéoglycanes (Sandgren *et al.*, 2004). Ces complexes sont retenus dans les endosomes précoces des pDC de la même façon que les CpG<sub>A</sub>, et active la voie TLR9-MyD88-IRF7 pour induire l'IFN sans induire la maturation des pDC. Ainsi, la surexpression de LL-37 dans le psoriasis est en partie responsable de la rupture de la tolérance envers l'ADN du soi et ainsi de l'induction de l'activation des pDC.

### III. F. 2. Reconnaissance de l'ARN du soi par les pDC

Normalement, les ARN du soi relargués par des cellules endommagées sont incapables d'activer les pDC en raison de leur rapide dégradation par la présence abondante en RNases dans le milieu extracellulaire. De plus, les modifications subies par l'ARN, comme les queues polyA et les méthylations nucléotidiques, participent à immunogénéicité faible contre les ARN du soi. Les ARN du soi, notamment ceux riches en uridine ou en uridine et guanosine (U/UG-RNA) peuvent induire la production de l'IFN-I par TLR7 dans les pDC quand ils sont emmenés dans les endosomes par des auto-anticorps ou des liposomes (Vollmer *et al.*, 2005). Ces complexes activent aussi les lymphocytes B en passant par le BCR (B-cell Receptor) et TLR7. SLE est caractérisé par la présence d'auto-anticorps contre à la fois l'ADN du soi et les U/UG-RNA (Marshak-Rothstein, 2006).

### III. F. 3. Les pDC et l'IFN dans les maladies auto-immunes



**Figure 22: La voie des pDC et de l'IFN-I dans les maladies auto-immunes.**  
Modifié à partir de (Ivashkiv and Donlin, 2014)

#### III. F. 3. i. Généralités sur le rôle des pDC et de l'IFN-I dans les maladies auto-immunes

Les IFN de type I sont des cytokines pléiotropiques avec une activité antivirale qui augmente les réponses immunitaires innées et adaptatives. Cependant, l'activation chronique et la sécrétion d'IFN-I en l'absence d'infection peut induire des maladies auto-immunes, comme par exemple le SLE et le psoriasis (Kim *et al.*, 2015; Rowland *et al.*, 2014). Ainsi, les pDC jouent un rôle très important dans l'auto-immunité. Les pDC sont capables de migrer en direction des tissus périphériques pendant l'inflammation, ce qui renforce l'idée que les pDC sont des acteurs importants dans l'immunité innée et adaptative *in vivo*. Par exemple, dans le psoriasis, les lésions précoces de la peau sont hautement infiltrées par des pDC activées, ce qui est corrélé avec une diminution du nombre de pDC circulantes dans le sang. Les pDC peuvent être activées par l'ADN du soi qui est relargué après les lésions de la peau. Lorsque la production de l'IFN est bloquée avec des anticorps anti-BDCA2, le développement des lésions de la peau est inhibé dans un modèle xénotransplanté.

Les patients sous traitement long d'IFN-I contre des cancers et des infections chroniques virales, induisent des syndromes de type SLE. De façon intéressante, les thérapies à base anti-TNF $\alpha$  dans la maladie de Crohn et de l'arthrose rhumatoïde peuvent aussi induire des syndromes de type SLE chez les patients à cause de la régulation croisée du TNF $\alpha$  et de l'IFN $\alpha$ . En effet, le TNF $\alpha$  inhibe la production de pDC à partir de progéniteurs hématopoïétiques CD34 $^{+}$  et supprime la production d'IFN $\alpha/\beta$  par les pDC en réponse au virus de la grippe.

Ainsi, le blocage de la voie de signalisation de l'IFN, par des anticorps anti-IFN ou anti-IFNAR, représente une voie thérapeutique potentielle dans le SLE (Banchereau and Pascual,

2006; Bronson *et al.*, 2012; Kirou and Gkrouzman, 2013 ; Trinchieri, 2010).

### III. F. 3. ii. Les effets néfastes des pDC et l'IFN-I dans le SLE

Comme détaillé précédemment, l'agrégation de l'ADN ou l'ARN du soi relargués par les cellules en de larges complexes peuvent efficacement activer les pDC ; cependant l'origine de ces complexes immunostimulateurs reste méconnue. Dans le SLE, la rupture de la tolérance envers l'ADN du soi a été attribuée à la formation de complexes entre les acides nucléiques endogènes et des complexes d'anticorps anti-ADN du soi (Rowland *et al.*, 2014). Ces complexes isolés chez des patients SLE activent TLR9 des pDC de façon continue, ce qui initie la sécrétion de l'IFN-I mais aussi celle de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. En effet, les auto-anticorps spécifiques de l'ADN se fixent sur les récepteurs à faible affinité Fc pour les IgG (FcγRIIA; connu sous le nom de CD32). Ce complexe immunitaire est internalisé et transporté dans des compartiments endosomaux contenant TLR9. Ces mêmes fragments contiennent aussi le LL-37, qui est alors indispensable à l'endocytose de l'ADN du soi par le CD32. Dans le SLE, il a été suggéré que les neutrophiles sont la source prédominante d'acides nucléiques endogènes. Les patients SLE ont dans le sérum un niveau élevé d'IFN-I qui corrèle avec l'activité et la sévérité de la maladie. La production constante d'IFN-I par les pDC induit une hyperactivation du système immunitaire, la maturation des mDC qui stimulent les lymphocytes T autoréactifs, mais aussi stimule la différenciation de lymphocytes B autoréactifs qui sécrètent alors des auto-anticorps. L'activité du SLE et les niveaux d'auto-anticorps sont associés à une signature spécifique de l'IFN $\alpha$  caractérisée par une surexpression des ISG dans le sang et la peau. Cette production constante d'IFN-I provoque ainsi des dommages tissulaires. Les pDC sont donc impliquées dans la pathogénicité du SLE (Dulek *et al.*, 2014; Hagberg and Ronnblom, 2015).

D'autre part, l'activation constante des pDC les rend résistantes à la thérapie par les glucocorticoïdes administrés aux patients. Ce traitement influencerait même la survie des pDC. Récemment, il a été montré que sur 50 variants génétiques associés au SLE, plus de la moitié était liée au système de l'IFN-I ; le contexte génétique (notamment des variants dans *IRF5*, *STAT4* et *TLR7*) joue donc un rôle important dans la progression de la maladie.

HMGBI, comme vu précédemment, est une protéine nucléaire qui se fixe à l'ADN relargué par les cellules mortes ce qui induit la production de l'IFN-I par les pDC en réponse à ces complexes possédants de l'ADN (Tian *et al.*, 2007). De façon intéressante, et contrairement à LL-37, HMGBI peut se fixer uniquement à des agrégats multimériques d'ADN, comme le CpG<sub>A</sub> et non comme le CpG<sub>B</sub>. Le complexe ADN-HMGBI se fixe sur le récepteur RAGE, qui n'est pas impliqué dans son internalisation mais augmente la production d'IFN-I en facilitant l'association de

l'ADN avec TLR9 dans les endosomes précoces. Ainsi le modèle proposé pour expliquer la rupture de la tolérance envers l'ADN du soi dans le SLE est le suivant : LL-37 se fixe initialement sur des fragments de l'ADN relargués par des cellules apoptotiques et forment des agrégats, alors protégés de la dégradation par les nucléases. Le complexe LL-37-ADN se fixe ainsi à HMGB1. Après internalisation, le complexe LL-37-ADN-HMGB1 s'associe avec TLR9 dans les endosomes précoces en utilisant RAGE. Les anticorps IgG spécifiques de l'ADN se fixent au complexe LL-37-ADN-HMGB1, qui va alors être endocyté par FcγRIIA (Urbonaviciute and Voll, 2011).

### III. F. 3. iii. Rôle immunosuppresseur de l'IFN-I

L'IFN-I est connu pour avoir un rôle pathogénique dans les maladies auto-immunes en promouvant la présentation antigénique, les réponses lymphocytaires et en induisant l'expression des cytokines. Ainsi, l'amorçage par l'IFN peut contribuer à l'augmentation de l'activation des cellules et de la réponse aux facteurs inflammatoires dans les maladies auto-immunes. Cependant, IFN peut aussi avoir un rôle protecteur dans certaines maladies auto-immunes (Ivashkiv, 2013). L'hypothèse émise pour ce rôle protecteur de l'IFN suggère que l'IFN-I induit la protection en supprimant la production et la fonction des cytokines pro-inflammatoires, en supprimant la prolifération des types cellulaires pathogéniques et les réponses des cellules T<sub>H</sub>17 et en régulant la barrière hémato-encéphalique. Les maladies auto-immunes sont caractérisées par des fluctuations d'un grand nombre de facteurs qui régulent l'IFN-I, comme les PRR et les cytokines. Ainsi, les réponses IFN peuvent évoluer dans le temps et être différentes en fonction du stade de la maladie.

### III. F. 4. TRAIL dans les maladies auto-immunes

Le système TRAIL / récepteur de TRAIL semble aussi largement impliqué dans les maladies auto-immunes ou du moins dans la modulation de la réponse auto-immune. Dans un modèle de souris, l'absence de TRAIL ou de ses récepteurs ne semble pas induire des maladies auto-immunes, même si des traitements à base de TRAIL semblent diminuer la pathologie de certaines maladies. Cependant, le rôle de TRAIL dans les maladies auto-immunes reste controversé en fonction de la maladie et de l'environnement.

Les patients avec une sclérose multiple ou le SLE ont des niveaux élevés de TRAIL dans le sérum, indiquant une surexpression de ce ligand dans certaines maladies auto-immunes (Wandinger *et al.*, 2003). Des études sur la souris montrent que TRAIL joue un rôle crucial dans certaines maladies auto-immunes en régulant les réponses immunitaires afin d'éviter des réactions excessifs de la part d'auto-antigènes ou agents infectieux.

Si dans l'arthrose induite dans le collagène le rôle de TRAIL semble être dédié à la diminution de l'inflammation, de la production d'IFN et de la prolifération des lymphocytes T, dans l'arthrose rhumatoïde, TRAIL semble avoir un double rôle, à la fois en induisant l'apoptose mais aussi la prolifération de certaines cellules. Dans le diabète de type I, TRAIL semble aussi avoir un protecteur.

Cependant, il n'a toujours pas été déterminé quelles cellules étaient responsables du rôle préventif de l'auto-immunité et quelles cellules étaient affectées par ce mécanisme.

### III. G. LES THÉRAPIES ANTI-INTERFÉRON

Nous venons de décrire un grand nombre de pathologies dans lesquelles l'interféron joue un rôle prépondérant. Pendant longtemps, l'IFN était utilisé comme traitement dans les infections virales et bactériennes et dans les cancers principalement afin d'éradiquer les cellules infectées ou tumorales. On peut citer par exemple les composés de la famille de l'imiquimod utilisés dans les infections virales et les cancers, les thérapies à base d'interféron recombinant comme l'IFN $\alpha$ 2a ou l'IFN $\alpha$ 2b (contre les leucémies, mélanomes malins, sarcomes de Kaposi liés au SIDA mais aussi les autres types de cancers et les maladies vasculaires et principalement dans la thérapies anti-HCV) ou une association d'interféron alfa pegylé avec l'antiviral ribavirin et enfin le développement de séquences immunostimulatrices (ISS = immunostimulatory sequences) qui ciblent principalement TLR9 mais peuvent aussi cibler TLR7.

Cependant, en raison des études sur les effets néfastes de l'IFN dans de plus en plus de maladies, de nombreuses stratégies thérapeutiques inhibitrices de la production massive d'IFN se sont développées en ciblant diverses étapes de la voie de signalisation de l'IFN, notamment dans les traitements des maladies auto-immunes.

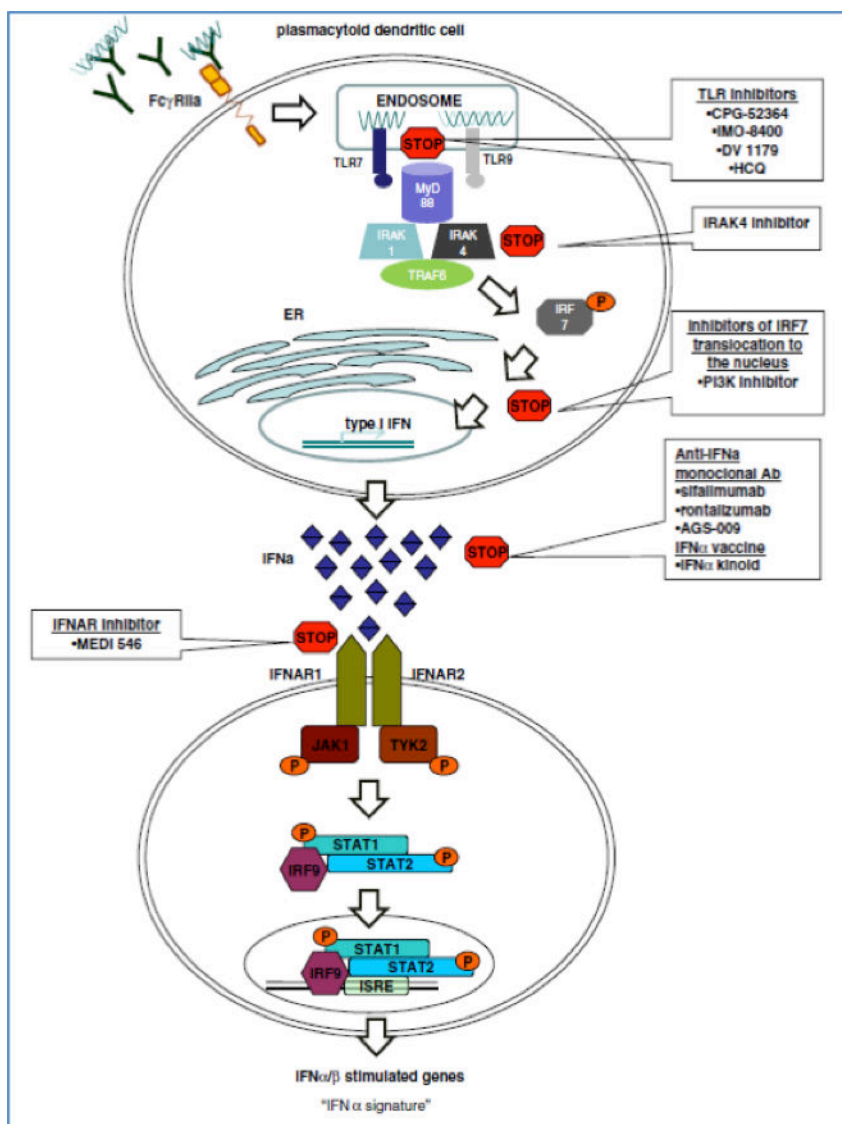
Nous allons détailler brièvement les principales stratégies mises en place pour inhiber la production d'IFN ou ses effets dans les pDC.

- La *chloroquine* est une 9-aminoquinoline connue depuis 1934, notamment pour ses effets contre le paludisme (Savarino et al., 2003). Elle est aussi utilisée dans le traitement des maladies autoimmunes comme l'arthrite rhumatoïde et le SLE (Essai clinique de 2005). La chloroquine ou l'hydroxychloroquine (molécule plus stable), sous son état non protoné, peut remonter le pH de diverses organelles, notamment des endosomes, en se protonant ce qui va inhiber différentes enzymes comme les hydrolases acides. Ainsi, la chloroquine agit sur la réplication de divers virus en interagissant avec leur entrée médiée par l'endocytose ou sur les étapes tardives de la réplication de virus à enveloppe. Les virus touchés par l'effet de la chloroquine

sont par exemple le virus de la maladie de Borna, le MVM (Minute Virus of Mice) et le ASLV (Avian sarcoma leukosis virus). De façon plus intéressante, on peut aussi citer des virus qui ciblent l'Homme comme le virus de l'Hépatite A (HAV) – la chloroquine inhibe sa décapsidation -, l'accumulation de particules non-infectieuses de HSV1 dans l'appareil de Golgi, l'inhibition de la réplication de flavivirus, de coronavirus comme SARS (Vincent *et al.*, 2005) et Influenza (même si les effets ne sont visibles que *in vitro* et pas *in vivo* (Paton *et al.*, 2011; Vigerust and McCullers, 2007)). La chloroquine cible la réplication du VIH-1 et VIH-2 ainsi que permet de réduire l'activation immunitaire excessive (Savarino *et al.*, 2001a; Savarino *et al.*, 2001b; Tsai *et al.*, 1990). Ainsi, la chloroquine est arrivée en phase II d'un essai clinique en 2009.

- Très récemment, des **anticorps anti-TLR7** ont montré des résultats prometteurs quant à l'inhibition de l'activation de la voie de TLR7 (Kanno *et al.*, 2015). Les auteurs ont tout d'abord montré que TLR7 pouvait être membranaire sur des macrophages et des DC et ainsi que les anticorps qu'ils avaient eux mêmes produits étaient internalisés dans des endolysosomes. Ce résultat bien que surprenant semble plausible comme il a aussi été montré récemment que TLR9 pouvait aussi être membranaire (Lindau *et al.*, 2013; Onji *et al.*, 2013).
- Les **glucocorticoïdes** semblent aussi pouvoir affecter les fonctions des pDC probablement en induisant leur apoptose (Boor *et al.*, 2006; de Ruiter *et al.*, 2015; Zhan *et al.*, 2015).
- Les **anticorps anti-BDCA-2** sont capables d'inhiber la production d'IFN-I par les pDC. Depuis 2001, il est connu que l'engagement du récepteur spécifique des pDC, BDCA2, inhibe la voie d'activation de TLR7 et de TLR9, autant la production d'IFN que la production de cytokines pro-inflammatoires (Cao *et al.*, 2007 ; Dzionek *et al.*, 2001 ; Rock *et al.*, 2007). Il semblerait que la compagnie Biogen soit en train de faire des essais cliniques sur des anticorps. Très récemment, un nouvel anticorps monoclonal de BDCA2, 24F4A, montre des résultats très prometteurs dans le traitement du SLE (Pellerin *et al.*, 2015).
- Les **séquences immunorégulatrices** (IRS = immunoregulatory sequences) (Barrat *et al.*, 2005; Duramad *et al.*, 2005) utilisés principalement dans les études dans le traitement des maladies autoimmunes. On peut citer par exemple, le CPG-52364 et le DV-1179, tout deux antagonistes des TLR7/8/9 en phase clinique I. Nous pouvons aussi citer IMO-3100 et IMO-8400 qui sont en phase clinique II dans le traitement de patients atteints de psoriasis. Il existe un plus grand nombre de molécules qui ont pu être utilisées dans différents essais cliniques citées dans la revue de (Hennessy *et al.*, 2010). Plus récemment, la molécule DV056, inhibitrice de TLR7 et de TLR9, a été utilisée dans une étude pour bloquer la production d'IFN-I *in vivo* dans des macaques infectés par le SIV (Kader *et al.*, 2013).

- D'autres acteurs de la voie de signalisation des TLR ont pu être ciblés comme les protéines *IRAK4* et *PI3K*, indispensables dans la translocation de IRF7. Un grand nombre d'inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR ont été impliqués dans des essais cliniques plus ou moins concluants notamment dans des traitements anti-cancéreux ou contre des maladies auto-immunes (Stark *et al.*, 2015; Thorpe *et al.*, 2015).
- De nombreux *anticorps anti-IFN $\alpha$*  et des *inhibiteurs anti-récepteurs à l'IFN* ont aussi été développés et sont dans différentes phases cliniques dans les traitements anti-SLE (Kirou and Gkrouzman, 2013) ; on peut citer par exemple le Sifalimumab (Phase II), Rontalizumab (Phase II) et le AGS-009 (Phase I) qui sont des anticorps monoclonaux anti-IFN alpha humanisés ou encore le MEDI-546 qui est un anticorps monoclonal anti-récepteur IFN $\alpha$  humanisés Phase II). On peut aussi citer l'IFN $\alpha$ -Kinoid, une drug composée d'IFN $\alpha$  inactivé couplé à des protéines porteuse (« carrier ») qui induit la production d'anticorps polyclonaux qui neutralisent les 13 sous-types d'IFN $\alpha$  (Phase II) (Lauwers *et al.*, 2013).



**Figure 23 :** Les différentes protéines des pDC qui ont été ciblées dans des essais cliniques contre le SLE.

Modifié à partir de (Kirou and Gkrouzman, 2013)





# **HYPOTHÈSES DE TRAVAIL**



Les mécanismes d'activation des pDC par des acides nucléiques viraux mais aussi endogènes ainsi que l'existence de molécules agonistes de TLR7 ou de TLR9 sont relativement bien documentés. Inversement, les mécanismes d'inhibition de la voie de l'IFN restent mal connus. Certaines molécules synthétiques comme la chloroquine ou la rapamycine peuvent diminuer la production d'IFN-I selon divers mécanismes. Il a par ailleurs été montré que l'activation d'ILT-7 et de BDCA-2, deux protéines membranaires spécifiques des pDC, par des anticorps bloquait la production de l'IFN des pDC après une stimulation virale.

L'activation des pDC induit une forte réponse immunitaire. En effet, les pDC sécrètent 1000 fois plus d'IFN-I que tous les autres types cellulaires et induisent un large panel d'ISG et de cytokines pro-inflammatoires en réponse aux boucles autocrine et paracrine de l'IFN. D'autre part, les pDC peuvent aussi exprimer le ligand pro-apoptotique de la superfamille du TNF, TRAIL, afin qu'elles deviennent des cellules tueuses, les IKpDC, responsables de la mort d'un grand nombre de cellules endommagées. En effet, dans des infections chroniques comme avec la dengue, nous avons pu montrer que le virus active les pDC afin qu'elles expriment TRAIL et produisent de l'IFN-I. Cette activation va permettre de contenir la propagation du virus. Cependant, l'activation prolongée de l'activation des pDC et par conséquent la production massive de l'IFN a des effets secondaires importants dans les maladies auto-immunes. Il est aussi maintenant admis que l'IFN-I peut avoir des effets délétères lors d'infections virales chroniques, comme le VIH. Il a été montré plus récemment que l'IFN-I pouvait aussi avoir un rôle nocif dans les infections aiguës, comme la grippe, en endommageant les tissus environnants. Lors de l'infection par le VIH, nous pensons que la surproduction d'IFN-I est en partie responsable de la mort des lymphocytes en régulant l'expression du facteur pro-apoptotique TRAIL. Il semble donc particulièrement judicieux de mettre au point des modulateurs de la production d'IFN- $\alpha$  durant certaines phases de la maladie du SIDA. Il est important que ces inhibiteurs aient des effets réversibles, qui cessent lors de l'arrêt du traitement. En effet, bien qu'ayant des effets délétères, les IFN de type I ont également des effets antiviraux puissants et contribuent à la diminution de l'infection virale. Il devient donc indispensable de trouver de nouveaux mécanismes d'inhibition des pDC afin de répondre à une demande de plus en plus importante dans le domaine des thérapies anti-IFN et plus généralement dans le but de moduler l'activation immunitaire des pDC.

Ainsi, nous pouvons citer divers systèmes dans lesquels l'histamine et le système immunitaire sont liés. Tout d'abord, Mazzoni *et al.*, ont montré que l'histamine, une monoamine impliquée dans la réponse allergique, inhibait fortement la production des cytokines par les pDC. Gschwandtner *et al.*, ont suggéré que cette inhibition d'IFN-I passait par le récepteur à l'histamine, H4R (Gschwandtner *et al.*, 2011). D'autre part, il a été montré que les patients atopiques, caractérisés par une hyper sécrétion d'histamine, produisaient moins d'IFN-I en réponse à une

stimulation virale de la grippe. Ces résultats bien que surprenants ont été montrés dans divers systèmes cellulaires dans la revue par O'Mahony *et al.* Et enfin, il semblerait important que la production de l'IFN, produit notamment par les neurones dans le cerveau, puisse être régulée rapidement et efficacement, par le relargage de neurotransmetteurs, afin d'éviter des dommages irréversibles tissulaires dû aux conséquences d'une présence massive d'IFN-I.

A partir de ces divers constats, nous avons étendu ces résultats à diverses mono- et polyamines naturelles et synthétiques. Nous avons aussi étudié quel était le récepteur de ces amines présents sur les pDC afin d'identifier un nouveau mécanisme d'inhibition de l'activation des pDC (**Article 1**). Les pDC sont capables de s'activer, c'est-à-dire d'induire la voie de signalisation de l'IFN-I après reconnaissance des acides nucléiques viraux par les TLR une fois le pathogène endocyté. Cependant, il semblerait qu'une petite partie de ces cellules puissent être infectées par le virus du VIH (3,5%). Ainsi, alors que les Articles 1, 2 et 4 se focalisent sur l'activation des pDC par la voie de l'endocytose, nous avons voulu étudier la morphologie des pDC, *in vitro*, en présence d'une grande quantité de virus VIH, comme après leur migration vers les organes lymphoïdes, afin de commencer à phénotyper les cellules infectées (**Article 3**). Nous nous sommes, par la suite, demandés si le récepteur CD4 et le corécepteur CXCR4 du virus VIH étaient importants pour la reconnaissance virale lors de l'activation des pDC par le virus du VIH (**Article 4**).

La transfection de cellules primaires est difficile, la transfection de pDC primaires est presque impossible. En effet, les pDC sont (1) des cellules extrêmement rares (moins de 1% des PBMC (Peripheral blood mononuclear cells) et fragiles (ne peuvent pas être gardées en culture plus de 48h), (2) des cellules avec une grande activité d'endocytose et (3) spécialisées dans la reconnaissance des ARN et des ADN. Nous avons voulu mettre au point la transfection de siRNA dans des pDC primaires humaines afin de tout d'abord pouvoir étudier des protéines spécifiques des pDC et mieux comprendre leur fonctionnement et par la suite d'affiner notre étude sur les amines et découvrir leur cible et leur mécanisme dans l'objectif d'élaborer de nouvelles solutions thérapeutiques qui pourraient être utilisées localement dans des pathologies qui nécessitent la modulation des pDC (**Article 2**).

# **RÉSULTATS**



## ARTICLE N° I

### Les amines naturelles inhibent l'activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes en induisant l'engagement de CXCR4

Nikaïa Smith, Nicolas Pietrancosta, Sophia Davidson, Jacques Dutrieux, Lise Chauveau, Michel Dy, Daniel Scott-Algara, Bénédicte Manoury, Isabelle McCort-Tranchepain, Olivier Schwartz, Andreas Wack, Sébastien Nisole, Jean-Philippe Herbeuval

#### Manuscrit en révision à NATURE COMMUNICATIONS

**Introduction:** Les pDC sont la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes et sont ainsi considérées comme les cellules professionnelles de la production d'IFN de type I. L'IFN-I est un antiviral puissant, indispensable au contrôle de la propagation virale lors des phases aiguës de l'infection. Cependant, l'IFN-I peut s'avérer avoir des effets délétères dans un grand nombre d'infections chroniques et de maladies auto-immunes. Ainsi, il semble indispensable de découvrir les mécanismes régulateurs des pDC ainsi que des modulateurs de l'activation des pDC. Nous nous sommes intéressés au rôle de différentes amines dans l'activation des pDC ainsi que leur mécanisme de régulation qui passe par l'engagement de CXCR4.

**Méthode:** Les pDC sont purifiées par tri magnétique (sélection négative) à partir de PBMC du sang de donneurs sains. Les cellules ont ensuite été pré-incubées avec les différentes monoamines ou polyamines à tester avant d'être cultivées avec différents virus sur la nuit. L'expression de TRAIL, la production d'IFN ainsi que l'activation des différents gènes de la voie de signalisation de l'IFN ont été étudiés en cytométrie en flux, en microscopie ou en RT-qPCR. D'autre part, nous avons aussi utilisé la technique de siRNA afin d'inhiber la production de la protéine cible, CXCR4. Une étude approfondie de modélisation a été effectuée sur l'interaction entre la cible et les molécules étudiées. D'autre part, les résultats ont été validés sur un modèle *in vivo* de souris de 12 semaines infectées par un virus de la grippe X31 après avoir reçu un traitement avec les amines.

**Résultats:** Nous avons ainsi montré que les monoamines (histamine, dopamine, sérotonine) et les polyamines (spermine et spermidine) inhibent l'activation complète des pDC stimulées par divers virus. Nous avons aussi montré que la fonction amine de ces molécules était indispensable à leur activité. Par la suite, nous avons identifié CXCR4 comme étant le récepteur des amines sur les pDC. Ainsi, nous avons pu montrer que les amines pouvaient réguler les pDC en passant par CXCR4 et que ce récepteur était un potentiel interrupteur de l'activation des pDC lors des infections virales.





## **INTRODUCTION : LE RÔLE DES AMINES DANS LA PHYSIOLOGIE**

### **I. GÉNÉRALITÉS SUR LES MONOAMINES**

L'histamine (HA), une amine biogène, a une courte durée de vie et est synthétisée à partir de l'acide aminé L-histidine. L'histamine peut être produite par un grand nombre de cellules et est impliquée dans un grand nombre de fonctions physiologiques, comme la prolifération et la différenciation, l'hématopoïèse, le développement embryonnaire, la régénération et la cicatrisation mais aussi certaines fonctions immunitaires (O'Mahony *et al.*, 2011). Les mastocytes, les basophiles et les neurones histaminergiques sont les cellules les mieux décrites comme source d'histamine ; cependant d'autres types cellulaires comme les plaquettes, les APC, les NK, les cellules épithéliales et les lymphocytes T et B peuvent synthétiser de l'histamine sous l'influence de cytokines telles que IL-1, IL-3, IL-12, IL-18, GM-CSF et TNF- $\alpha$  (Jutel *et al.*, 2009). Les mastocytes et les basophiles stockent de larges quantités d'histamine qui vont être relarguées par dégranulation en réponse à des stimuli immunologiques, comme la fixation d'un IgE spécifique d'un allergène sur son IgER. Au niveau des neurones, l'augmentation du calcium libre  $Ca^{2+}$  intracellulaire provoqué par l'arrivée d'un potentiel d'action va déclencher la libération de l'histamine. Les autres types cellulaires ne stockent pas l'histamine mais la relargue après sa synthèse et peuvent aussi être régulés par cette dernière. En effet, les cellules immunitaires expriment les récepteurs à l'histamine (HR). L'histamine peut alors recruter les cellules immunitaires vers les tissus cibles et affecter leur maturation, activation, polarisation et fonctions effectrices, menant à des réponses tolérogènes ou pro-inflammatoires. L'histamine est connue pour avoir des effets immédiats dans les réponses d'hypersensibilité, comme l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la contraction des muscles lisses, les réponses de démangeaisons et les œdèmes cutanés. D'autre part, l'augmentation locale de l'histamine sur des sites inflammés est moins bien comprise.

L'effet régulateur de l'histamine dépend de sa fixation sur l'un de ces quatre récepteurs (H1R à H4R). Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR = G protein-coupled receptor) caractérisée par sept domaines transmembranaires. Certains antagonistes des HR ont des actions sur d'autres GPCR, ce qui peut expliquer les effets secondaires observés lors de divers traitements avec ce type de molécules. H1R et H2R ont de fortes homologues et leur signalisation respective peut avoir des effets synergiques ou antagonistes. H1R qui possède la sous-unité  $G\alpha_{q/11}$  et H2R qui possède la sous-unité  $G\alpha_s$  sont tout deux exprimés sur un grand nombre de cellules similaires mais induisent des signaux activateurs intracellulaires différents, comme l'activation de la cyclase adénylate, menant à l'activation de PLC, PKC, PKA, cAMP... D'autre part H3R et H4R, qui sont couplés la sous-unité  $G\alpha_{i/o}$ , sont exprimés

de façon plus hétérogènes sur différents types cellulaires mais ont des propriétés moléculaires et pharmacologiques similaires et induisent l'inhibition de leur voie de signalisation en bloquant l'activité adénylate clyclase et donc en réduisant les niveaux de cAMP. On peut remarquer que H3R joue un rôle important dans la régulation de l'inflammation alors que H4R joue un rôle important dans les maladies auto-immunes, dans divers cancers et aussi dans les allergies (O'Mahony *et al.*, 2011).

L'histamine a tout d'abord était décrite pour son rôle dans les allergies. Une fois libérée par les mastocytes, l'histamine se fixe à H1R et H2R des cellules épithéliales ce qui va avoir des conséquences importantes dans l'intolérance alimentaire, les allergies et l'inflammation. L'histamine peut aussi avoir un rôle dans la régulation de la sécrétion d'acide par l'estomac. Finalement, l'histamine est aussi un neurotransmetteur, qui module le contrôle de l'éveil et est synthétisé et libéré par les neurones histaminergiques suite à un stimulus électrique et va se lier à des récepteurs post- ou présynaptiques (O'Mahony *et al.*, 2011).

Le rôle immuno-modulateur de l'histamine par fixation à H2R sur les DC a largement été établi (Caron *et al.*, 2001; Mazzoni *et al.*, 2001; van der Pouw Kraan *et al.*, 1998). Les DC sont souvent situées à proximité des mastocytes dans les muqueuses. Les DC exposées à l'histamine sont capables de mieux présenter l'antigène et induisent une meilleure polarisation Th1 à travers H1R, alors que l'activation par H2R induit plutôt une sécrétion d'IL-10 et la polarisation de Th2. Il semblerait cependant que l'accumulation de pDC murines, de DC CD11b<sup>+</sup> mais pas CD8<sup>+</sup> dans les ganglions drainants est dépendant de H2R (Dawicki *et al.*, 2010). A l'inverse des autres sous-types de DC, les cellules de Langerhans semblent n'être régulées que par l'histamine car elles n'expriment pas H1R ou H2R, mais H4R qui peut être augmenté après exposition à de l'IFN $\gamma$  et résulte en la diminution de CCL2 et IL-12. D'autre part, l'activation des monocytes par les TLR est altérée par l'histamine, notamment TNF- $\alpha$ , IL-12 et IL-18 qui sont inhibés alors que la sécrétion d'IL-10 est augmentée. Cet effet est médié principalement par H2R. De plus, l'histamine inhibe l'expression de CD14, d'ICAM-1 et de CD80 sur des monocytes humaines (Morichika *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2004). Cependant, il n'a pas été montré quel était le rôle des récepteurs à l'histamine sur les DC.

Les cellules épithéliales expriment elles aussi H1R, H2R et H4R. Les cellules épithéliales de l'intestin sont probablement protégées des infections bactériennes pathologiques grâce à la fixation de l'histamine sur son récepteur H1R à de faibles concentrations. Les mastocytes stimulés par la voie de TLR2/NOD2 peuvent relarguer de l'histamine, ce qui réduit les fonctions de la barrière épithéliales (Wu *et al.*, 2007). Ce résultat suggère que la protection de la muqueuse gastro-intestinale contre l'invasion des pathogènes dépend en partie de la concentration locale de l'histamine. Ainsi, de faibles niveaux d'histamine peuvent être protecteurs alors que des niveaux

plus élevés peuvent être nocifs pour la protection épithéliale contre les infections. L'activation de H1R sur les cellules épithéliales pulmonaires augmentent l'expression de TLR3 et la stimulation de ces cellules avec un ligand de TLR3, le poly (I:C) en présence d'histamine résulte en l'augmentation de la sécrétion d'IL-8, en la phosphorylation de NF-κB. Ainsi, H1R peut augmenter la réponse des cellules épithéliales à certains ligands microbiens (Hou *et al.*, 2006).

Les cellules NK expriment H4R, ce qui induit leur chimiotaxisme vers l'histamine. L'inactivation de H2R sur les NK les inhibe et permet aux lymphocytes à répondre à la stimulation à l'IL-2, ce qui pourrait avoir un rôle intéressant dans les thérapies anti-cancéreuses. Dans un modèle murin présentant une absence d'histamine, les cellules NK T sont affectées et ne peuvent plus produire d'IL-4 et d'IFNγ après stimulation.

L'accumulation des granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) dans les tissus est régulée par l'histamine, par la voie de notamment H1R. Les éosinophiles peuvent migrer différemment selon les concentrations d'histamine à travers H1R, H2R ou H4R.

Les lymphocytes T et B expriment aussi les récepteurs à l'histamine et peuvent être modulées de diverses façons par cette dernière (O'Mahony *et al.*, 2011).

Hormis son rôle dans les fonctions immunitaires, l'histamine joue un rôle prépondérant (1) dans le cerveau, dans lequel H1R et H2R ont des actions plutôt excitatrices sur les neurones alors que H3R inhibe le relargage des neurotransmetteurs ; (2) dans le comportement alimentaire en inhibant l'appétit par l'activation de H1R dans l'hypothalamus ; et (3) dans des fonctions de thermorégulation en activant les voies H1R et H2R dans le système nerveux central (Tabarean, 2015).

Recepteur	GPCR α-subunit	Expression	Signaux intracellulaires
H1R	Gα <sub>q</sub>	Cellules des muscle lisses, cellules nerveuses, cellules épithéliales, neutrophiles, eosinophiles, monocytes, macrophages, DC, lymphocytes T et B	PLC, PIP2, DAG, IP3, Ca <sup>2+</sup> , PKC
H2R	Gα <sub>s</sub>	Cellules des muscle lisses, cellules nerveuses, cellules épithéliales, neutrophiles, eosinophiles, monocytes, macrophages, DC, lymphocytes T et B	Cyclase adénylate, cAMP, PKA, CREB, EPAC
H3R	Gα <sub>i/o</sub>	Neurones histaminergique, eosinophiles, monocytes	Inhibe la cyclase adénylate et cAMP, augmente les niveaux de Ca <sup>2+</sup>
H4R	Gα <sub>i/o</sub>	eosinophiles, DC, cellules de Langerhans, neutrophiles, lymphocytes T, basophiles, mastocytes	Inhibe la cyclase adénylate et cAMP, augmente les niveaux de Ca <sup>2+</sup>

**Table RI : L'expression et la voie d signalisation des récepteurs à l'histamine**  
Modifié à partir de (O'Mahony *et al.*, 2011)

La dopamine (DA) est un neurotransmetteur issu de l'acide aminé tyrosine. Dans le système nerveux central, la dopamine active les récepteurs dopaminergiques postsynaptiques. La

dopamine est minoritaire dans le cerveau et elle joue un rôle modulateur essentiel dans la motricité et psychisme. La dopamine est principalement connue pour être le précurseur de l'adrénaline et de la noradrénaline. Il existe actuellement cinq types de récepteurs de la dopamine (D1 à D5), qui sont tous des GPCR. D1 et D5 sont couplés à la protéine  $G_s$  qui augmente l'adénylate cyclase et les sous-types D2, D3, D4, sont couplés à la protéine  $G_i$  qui diminue l'adénylate cyclase.

La sérotonine (5-HT), une autre monoamine endogène, est un neurotransmetteur présent dans le système nerveux central mais elle est en majorité présente en tant qu'hormone locale dans le tube digestif. Comme la dopamine, la sérotonine est minoritaire dans le corps mais elle y joue un rôle essentiel. 95% de la sérotonine présente dans le corps est produite dans l'intestin et elle provient principalement des plaquettes sanguines mais aussi des mastocytes, des lymphocytes et des macrophages. La sérotonine possède au moins 30 récepteurs différents appartenant à deux familles : les récepteurs ionotropes qui sont des récepteurs canaux à perméabilité cationique et des récepteurs couplés aux protéines G qui modulent l'activité neuronale en augmentant ou diminuant les potentiels d'action postsynaptiques. Elle est impliquée dans la régulation de fonctions telles que la thermorégulation, les comportements alimentaires et sexuels, le cycle veille-sommeil, la douleur, l'anxiété ou le contrôle moteur.

## **II. GÉNÉRALITÉS SUR LES POLYAMINES**

Les polyamines (PA) sont de petits polycations aliphatiques présents dans tous les organismes vivants et dont les plus communes sont la spermine (Sp – quatre groupes aminés) et la spermidine (Spd – trois groupes aminés) mais dont la concentration varie en fonction des différentes espèces (Pegg, 2014). Les polyamines sont principalement dérivées des acides aminés ornithine et méthionine et sont protonées à pH physiologique, ce qui leur confère la plupart de leurs fonctions (Miller-Fleming et al., 2015). Les PA sont synthétisées par la plupart des cellules dans des quantités variées. Les niveaux intracellulaires de PA sont étroitement régulés en fonction de leur biosynthèse, catabolisme et de leur transport. Dans le fluide extracellulaire, la concentration de polyamines est très faible par rapport à celle retrouvée dans l'environnement des cellules épithéliales intestinales qui contient des concentrations de PA de l'ordre du milli-molaire.

Les PA sont très importantes dans l'expression des gènes grâce à leur capacité de se fixer aux acides nucléiques et aux protéines ; ainsi elles peuvent stabiliser et remodeler la structure de la chromatine. Elles sont aussi très importantes dans la différenciation, la croissance et la prolifération cellulaire mais aussi dans l'apoptose et dans la migration cellulaire et donc dans

l'homéostasie tissulaire. Beaucoup d'études se sont aussi focalisées sur le rôle des PA en réponse et en protection contre différents types de stress cellulaires (ROS, pH, pression osmotique, température, etc.). Une seule maladie génétique connue, le syndrome Snyder-Robinson, est due à un défaut génétique dans la voie de signalisation de la biosynthèse des PA. D'autre part, les PA sont connues pour avoir un rôle dans les cancers et les maladies neuro-dégénératives, en raison de leur rôle primordial dans la croissance cellulaire (Pegg, 2009). Les PA se fixent elles aussi à un GPCR, le CaSR, qui influe sur les niveaux de calcium mais elles peuvent aussi être transportées à l'intérieur des cellules par des transporteurs.



## **Natural amines inhibit activation of human plasmacytoid dendritic cells through CXCR4 engagement**

Nikaïa Smith<sup>1,2</sup>, Nicolas Pietrancosta<sup>1</sup>, Sophia Davidson<sup>3</sup>, Jacques Dutrieux<sup>4</sup>, Lise Chauveau<sup>5</sup>, Michel Dy<sup>6</sup>, Daniel Scott-Algara<sup>7</sup>, Bénédicte Manoury<sup>8</sup>, Isabelle McCort-Tranchepain<sup>1</sup>, Olivier Schwartz<sup>5</sup>, Andreas Wack<sup>3</sup>, Sébastien Nisole<sup>4</sup>, Jean-Philippe Herbeuval<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> CNRS UMR-8601, Université Paris Descartes, CICB, 45 rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France.

<sup>2</sup> Chemistry & Biology, Nucleo(s)tides & Immunology for Therapy, CBNIT

<sup>3</sup> Francis Crick Institute, Mill Hill Laboratory, London, NW7 1AA, UK

<sup>4</sup> INSERM UMR-S 1124, Université Paris Descartes, 45 rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France

<sup>5</sup> Institut Pasteur, Virus & Immunity Unit, Paris 75015, France

<sup>6</sup> CNRS UMR-8147, Institut Necker Enfants Malades, Paris, France

<sup>7</sup> Institut Pasteur, Unité de Régulation des Infections Rétrovirales, Paris 75015, France

<sup>8</sup> INSERM U1151, Hôpital Necker, Paris, France

Address for corresponding author: Dr Jean-Philippe Herbeuval, CBNIT, CNRS UMR8601, Université Paris Descartes, Faculté des Saints Pères, 45 rue des Saints-Pères, 75006 France, [jean-philippe.herbeuval@parisdescartes.fr](mailto:jean-philippe.herbeuval@parisdescartes.fr), Tel: +33 1 42 86 38 32

Abbreviations: Human Immunodeficiency Virus (HIV-1), interferon alpha (IFN- $\alpha$ ), Toll-like receptor (TLR), Plasmacytoid dendritic cell (pDC), TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL), Fluorescent Compound (FC)

Key words: pDC, TLR, IFN- $\alpha$ , TRAIL, natural amine, CXCR4



Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are specialized in secretion of type I interferon (IFN $\alpha$ ) in response to pathogens. We show here that natural monoamines (histamine, serotonin, dopamine), and polyamines (spermine, spermidine) strongly inhibit pDC activation by RNA viruses. Furthermore, a synthetic analogue of histamine drastically reduces IFN-I and -III productions in an Influenza A-infected mouse model. We further identify CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) as the receptor used by amines to inhibit pDC. Using *in silico* docking experiments, we localize a binding pocket for amino molecules on the extracellular domain of CXCR4. Our study establishes an essential link between natural amines and innate immune system and identifies CXCR4 as a potential "on-off" switch of pDC activity with promising therapeutic perspectives.

Plasmacytoid dendritic cells (pDC) represent the first line of host defense against viruses and bacteria (Grouard *et al.*, 1997) and link innate to adaptive immunity (Colonna *et al.*, 2004). These immune cells are activated after recognition of pathogen nucleic acids by sensors such as Toll-like Receptor (TLR). pDC mainly express TLR7 and TLR9 (Jarrossay *et al.*, 2001; Kadowaki and Liu, 2002), which respond to single strand RNA (ssRNA) and imidazoquinolines (Diebold *et al.*, 2004; Heil *et al.*, 2004) for TLR7, DNA and CpG-containing oligonucleotides (Hemmi *et al.*, 2000) for TLR9. TLR activation triggers massive production of type I IFN (IFN- $\alpha/\beta$ ) and pro-inflammatory cytokines (Liu, 2005) through MyD88-mediated IRF7 signaling. RNA viruses, such as HIV and dengue, induce secretion of type I IFN and membrane expression of the proapoptotic ligand TRAIL, (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) a TNF superfamily member, *via* the TLR7 pathway, transforming pDC into potential killer cells (Interferon-producing killer pDC or IKpDC) (Gandini *et al.*, 2013; Hardy *et al.*, 2007; Stary *et al.*, 2009). In mouse, TRAIL-expressing killer pDC induce tumor cell apoptosis (Drobits *et al.*, 2012). In addition, prolonged pDC activation and consequently massive type I IFN production may have side effects in autoimmune diseases and chronic phases of AIDS (Banchereau and Pascual, 2006; Benlahrech and Patterson, 2011; Pascual *et al.*, 2006), and type I IFN overproduction is also linked to immunopathology in acute viral infections such as influenza (Davidson *et al.*, 2014). It is therefore of great clinical interest to be able to modulate pDC function and to understand the mechanisms underlying this pDC regulation.

The modulation of pDC activation remains only partly documented. Synthetic molecules such as chloroquine (Hardy *et al.*, 2007), rapamycin (Cao *et al.*, 2008) or anti-BDCA-2 antibodies (Blomberg *et al.*, 2003) decrease IFN type I production through various mechanism. The effect of natural molecules, such as amines, on pDC regulation remains less characterized. Natural amines are small positively charged molecules that play an essential role in multiple cellular functions. For example dopamine and serotonin are key neurotransmitters in central nervous system, whereas histamine is involved in allergy

response. Furthermore, natural amines may directly interact with immune cells by modulating their activation. The polyamine spermine inhibits monocyte and macrophage secretion of TNF- $\alpha$  (Perez-Cano et al., 2003; Zhang et al., 1999). Histamine strongly inhibits cytokine production by Influenza A-activated pDC (Mazzoni *et al.*, 2003) and down-regulates type I IFN production by activated pDC from psoriasis patients likely through the histamine receptor 4 (H4R) (Gschwandtner *et al.*, 2011). *In vivo*, the atopic phenotype in children, characterized by hyper histamine secretion, is associated with decreased virus induced IFN- $\alpha$  release (Bufe *et al.*, 2002).

We demonstrate here that natural monoamines (histamine, serotonin, and dopamine) and polyamines (spermine, spermidine) strongly inhibit type I IFN production, membrane TRAIL expression and IFN stimulating genes (ISG) by virus-stimulated pDC and PBMCs *in vitro* and *in vivo* in an Influenza-infected mouse model. Surprisingly, histamine receptors were not required for pDC inhibition. We thus investigated the mechanism by which amines act and demonstrate that the positive ammonium moiety was essential for the inhibitory activity. We then identified the chemokine receptor CXCR4 as the unexpected common player between amine effect and pDC inhibition. To precisely define the molecular interaction between CXCR4 and amines, we performed *in silico* docking experiments and identified a binding pocket for small amino molecules on the extracellular domain. Our study has clearly identified CXCR4 as a potential modulator of pDC activity and placed this receptor as a new promising therapeutic target in autoimmune and chronic infections.

## RESULTS

### **Histamine and a histamine analogue inhibit HIV-induced pDC activation**

As histamine has been shown to inhibit Influenza A virus (Flu)-induced pDC activation (Mazzoni *et al.*, 2003), we examined its effect on pDC activation by HIV-1. A dose range analysis indicated that histamine was active at 10 $\mu$ M on purified pDC (**Fig. 1a** and **Supplementary Fig. 1a**) without obvious toxicity (**Supplementary Fig. 1b**). A recent study showed that the histamine receptor 4 (H4R) was responsible for the inhibitory effect of histamine on human pDC (Gschwandtner *et al.*, 2011). Thus, we tested the effect of the H4R agonist clobenpropit (CB) (**Fig. 1b**). CB showed a stronger inhibitory effect than histamine, and reduced by approximately 90% the levels of IFN- $\alpha$  secreted following HIV stimulation (**Fig. 1c**). We verified that CB had no cytotoxic effect at the concentration of 10 $\mu$ M (**Supplementary Fig. 1b**). We next assessed IFN- $\alpha$  production kinetics for 24h, and observed that CB inhibited IFN- $\alpha$  production by HIV-stimulated pDC rapidly, after 12h of incubation (**Fig. 1d**). CB also strongly inhibited IFN- $\alpha$  production (**Fig. 1e**) and membrane TRAIL expression (**Fig. 1f**) by pDC cultured with Flu and Dengue, demonstrating that CB effect was not restricted to HIV. We compared CB inhibitory effect to a TLR-7 antagonist, A151 and showed that both molecules were similarly active (**Fig. 1g**). Relative TRAIL mRNA expression levels were assessed by RT-qPCR and confirmed these results (**Fig. 1h**).

### **The histamine receptors are not involved in inhibition of pDC**

We then asked whether the activity of CB was dependent on the histamine receptor 4. We tested CB in presence or not of the different histamine receptors antagonists (pyrilamine/PYR for H1R, cimetidine/CIM for H2R, thioperamide/THIO for H3R and JNJ7777120/JNJ for H4R) at 10 $\mu$ M on Flu-stimulated pDC (**Fig. 2a**). We found that none of these antagonists reversed inhibition of IFN- $\alpha$  production triggered by CB. To confirm the lack of involvement of H4R, we

tested CB on Flu-stimulated pDC isolated from wild type (WT) and H4R knock out (KO) mice (**Fig. 2b**). Flu was used to stimulate mouse pDC because HIV did not activate these cells (not shown). CB inhibited IFN- $\alpha$  production by Flu-stimulated pDC from wild type or H4R KO mice. Altogether, these results strongly suggested that the inhibitory effect of CB was not mediated by H4R.

We thus examined whether other natural aromatic amines (**Fig. 2c**) displayed similar inhibitory effects on pDC. Dopamine and serotonin (**Fig. 2d**) strongly inhibited HIV-mediated membrane TRAIL expression by pDC. We extended our study to non-aromatic polyamines (spermine, spermidine) and also found a strong inhibition of pDC activation (**Fig. 2d**). None of these molecules were cytotoxic at concentration used (**Supplementary Fig. 1b**). Relative TRAIL, IFN- $\alpha/\beta$  and MxA mRNA expression levels were assessed by RT-qPCR and showed that amines strongly inhibited transcription of these genes by HIV-activated pDC (**Fig. 2e** and **Supplemental 1c**).

### **Histamine and clobenpropit inhibit Flu-induced production of interferon in PBMC and 129S8 mice.**

We next investigated whether amines could exhibit inhibitory activity on antiviral cytokine responses *in vivo*. We first tested CB and Histamine effects on flu-exposed human PBMC. IFN- $\alpha/\beta$  but also IFN- $\lambda 2/3$  mRNA levels were significantly inhibited when cells were pretreated with histamine or CB before Flu exposure, validating that amines had inhibitory activity in a mixed culture system containing various immune cell populations (Fig. 3a).

We next tested histamine and CB effects in an *in vivo* model, using 12-week-old 129S8 mice infected with the X31 Flu strain or inoculated with vehicle control. At day 3 of influenza infection, mice pretreated with CB showed a strong reduction of IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  and IFN- $\lambda 2/3$  protein production in bronchioalveolar lavage (BAL) fluid compared to untreated flu-infected mice (Fig. 3b). When mice were treated with histamine prior to influenza infection, we

noticed a trend towards IFN reduction that was not statistically significant. This result may be explained by the fact that histamine is a natural amine, and therefore degraded by histaminase found in serum. Indeed, when histamine is used *in vitro*, cells are cultured in a FBS free ExVivo media to avoid the presence of histaminase contained in FBS.

### **The ammonium group (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) is essential to inhibit pDC activation**

To further study the role of amines on pDC activation, we synthesized the compound FFN-511 (Gubernator *et al.*, 2009), a pharmacological amine mimetic of serotonin (**Fig. 4a**). This compound contains an ammonium group (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) and a fluorescent coumarin core allowing microscopy and flow cytometry detection. FFN-511 (at 50 μM), strongly reduced membrane TRAIL expression and IFN type I production by HIV-stimulated pDC (**Supplementary Fig. 2a and 2b**) without any obvious cytotoxic effect (**Supplementary Fig. 2c**). To further investigate the role of the NH<sub>3</sub><sup>+</sup> function, we synthesized a negatively charged analog of FFN-511, FC-CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, in which the ammonium group (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) was replaced by a carboxylic (CO<sub>2</sub><sup>-</sup>) moiety. We examined the effect of the amine FFN-511 and its analogue FC-CO<sub>2</sub><sup>-</sup> on a panel of activation markers, by designing an RT-qPCR profiling assay. We selected a panel of genes that are usually activated after viral exposure: TRAIL, IFNs (IFN-α, IFN-β, IFN-γ, IFN-λ1 and IFN-λ2/3), chemokines (CXCL10), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and an early ISG (ISG56). Values for each transcript were normalized to expression level of ribosomal protein L13a (RPL13A). All selected genes were induced in pDC by HIV-1 and their transcription was dramatically inhibited by CB and FFN-511 but not by FC-CO<sub>2</sub><sup>-</sup> (**Fig. 4b**). The compounds did not apparently shut down the whole cell functions, as levels of IL-15 and iNOS genes were not affected.

### **Synthetic and natural amines inhibit TRAIL relocalization at the membrane of HIV-stimulated pDC**

We next performed microscopy experiments to determine whether amines could inhibit TRAIL relocalization in HIV-activated pDC. Indeed, we previously showed that under virus stimulation, TRAIL is relocalized from cytoplasm to cell membrane(Hardy *et al.*, 2007). Microscopy images were then processed using 3D interactive surface plot (ImageJ software) allowing membrane visualization (grey)(Gras *et al.*, 2013) (**Fig. 4c**). TRAIL was mostly localized intracellularly in non-activated pDC, and at the plasma membrane in HIV-stimulated cells (**Fig. 4d**). CB and FFN-511 significantly inhibited TRAIL localization at the cell membrane in HIV-stimulated pDC whereas FC-CO<sub>2</sub><sup>-</sup> did not. Image quantification of membrane TRAIL was performed and validated by flow cytometry results (**Fig. 4e**). Therefore, upon HIV-1 exposure, amines prevent the surface access of an intracellular pool of TRAIL.

#### **The chemokine receptor CXCR4 is required for amine inhibitory effect on pDC**

We further investigated the mechanism of action of amines on pDC. It has been reported that compounds bearing an ammonium function (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), such as spermine, can interact with the chemokine receptor CXCR4 by inducing its internalization and preventing CXCR4-tropic (X4) HIV infection in CD4<sup>+</sup> T cells(Pegg, 2013). Thus, we tested whether CB could induce CXCR4 internalization in pDC. We assessed intracellular and/or extracellular levels of CXCR4 by performing staining in permeabilized and non-permeabilized cells. When cells were incubated with CB, most of CXCR4 was detected intracellularly compared to untreated pDC (**Fig. 5a and b**). To visualize the interaction between CXCR4 and amines, we used the fluorescent properties of the synthetic amine FFN-511(Gubernator *et al.*, 2009). Confocal microscopy of pDC demonstrated a strong degree of co-localization between FFN-511 and CXCR4 (**Fig. 5c and d and Supplementary Fig. 3a**). We then silenced CXCR4 in pDC by small interfering RNA (siRNA) (**Supplementary Fig. 3b and 3c**). CXCR4 gene silencing suppressed the inhibitory effect of histamine, CB and spermine on type I IFN and TRAIL, in pDC stimulated by HIV-1 (**Fig. 5e**). It should be noticed that CXCR4 is not required for pDC activation by HIV-1(Pritschet *et*

*al.*, 2012; Smith *et al.*, 2014). To generalize our findings, we verified that CXCR4 silencing also blocked histamine, CB and spermine inhibitory effect on pDC activated by a CCR5-tropic (R5) HIV-1 and Flu (**5f and 5g**). Thus, CXCR4 siRNA experiments clearly demonstrate that CXCR4 is required for the inhibition of pDC by amines.

### **Identification of a binding pocket for amines on CXCR4 extracellular domain**

To better understand the molecular interaction between amines and CXCR4, we performed *in silico* docking experiments. The CXCR4 structure has been solved and the pocket in which antagonists lie has been identified (Rosenkilde *et al.*, 2004). Indeed, we docked our compounds in the appropriate binding pocket into a validated structure of CXCR4 (**Fig 6a**). We docked various conformers of our ligands (Histamine, CB, FC- NH<sub>3</sub><sup>+</sup> and Spermine) into CXCR4 and minimized the complex to establish the optimal model. The 2D representation was used for delineation of the detailed interactions between ligands and CXCR4. With this model, all four tested ligands were potentially interacting with CXCR4 in the same extracellular pocket (**Fig. 6a and 6b**). Poses were scored and compounds were classified depending of their properties. A high score indicates a strong interaction with various residues inside the pocket. As expected, FC-CO<sub>2</sub><sup>-</sup> showed the lower score, indicating a weak interaction between the compound and the binding site of CXCR4. Moreover, *in silico* scores of compounds directly correlated with their experimental potency (**Fig. 6c**). Interestingly, the well-known CXCR4 antagonist AMD-3100 binding site overlapped our identified amine binding pocket (Rosenkilde *et al.*, 2004) (**Fig. 6d**). To determine if the CB effect on pDC was due to a direct interaction with CXCR4, we quantified the expression of type I IFN (IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$ ) and TRAIL in pDC treated or not with AMD3100. Purified cells were pre-incubated with AMD3100 for 1h and then followed by histamine, CB and spermine for 1 hour and finally exposed to HIV-1 or Flu overnight. AMD3100 drastically abolished the effect of histamine, CB and spermine with type I IFN mRNA and protein, and TRAIL expression being restored in



activated pDC (**Fig. 6e** and **Supplementary Fig. 3d**). These results were confirmed on a panel of pDC cytokine secretion (IFN- $\gamma$  and IL6) and ISG (ISG56) (**Supplementary Fig. 3e**). On note, AMD3100 alone did not block IFN or TRAIL expression by HIV-activated pDC as previously reported (Pritschet *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2014). Altogether, these results unambiguously demonstrate that CXCR4 is required for the inhibitory activity of amines on pDC activation.

## **DISCUSSION**

Plasmacytoid dendritic cells are innate immune cells implicated in multiple diseases due to their capacity of secreting massive levels of type I IFN, in particular IFN- $\alpha$  (Fitzgerald-Bocarsly and Jacobs, 2010). This cytokine provides essential immunity against viruses, and critically contributes to the reduction of viral spread. However, since the over production of type I IFNs may also have deleterious effects, pDC response should be under tight control (Herbeuval and Shearer, 2007).

Natural amines, which are present in all eukaryotic cells, display multifunctional characteristics during cell differentiation and exhibit immunomodulatory functions (Perez-Cano *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 1999). Previous studies described histamine as a strong inhibitor of type I IFN and cytokine production by pDC through histamine receptors (H4R) (Gschwandtner *et al.*, 2011; Mazzoni *et al.*, 2003). Using histamine and the selective H4R agonist, clobenpropit (CB), we showed that these two molecules strongly inhibit type I IFN production by HIV or dengue-activated pDC. However, the use of an H4R antagonist and of H4R KO murine cells did not impact CB effect on IFN- $\alpha$  production by activated pDC. This unexpected result established that the effect of CB is independent on histamine receptors. We further show that histamine and histamine analogues (CB) were not the only compounds with immunomodulatory function on pDC, as other natural aromatic amines (serotonin and dopamine) and polyamines (spermine and spermidine) also inhibited type-I IFN production and membrane TRAIL expression by HIV-activated pDC. We next extended our study to mixed

cultures, which confirmed that histamine and CB can exert inhibitory activity in the context of multiple immune cell types. To extend our findings on the inhibitory potential of amines *in vivo*, we tested the natural amine histamine and the synthetic CB in a mouse model, in which induction of type I and type III IFN production by Flu was well characterized (Davidson *et al.*, 2014). Mouse pretreated with CB showed a massive reduction of types I and III IFN production, validating that amines have inhibitory activity *in vivo*. These results suggest that modulation of IFN by amine-like small molecule drugs may represent a novel therapeutic approach in situations where excessive IFN drives inflammation, autoimmunity or immunopathology.

Natural (histamine, dopamine, serotonin, spermine, spermidine) and synthetic (CB) molecules do not exhibit any evident structural similarities besides the presence of a  $\text{NH}_3^+$  and  $\text{NH}_2^+$  cation at physiological pH. We synthesized the well characterized fluorescent serotonin analogue, FFN-511 (Gubernator *et al.*, 2009) to better understand the role of the amino group on pDC modulation. The FFN-511 strongly inhibited the expression of several cytokines, including IFN type I, -II, -III, and the activation of various ISG, in HIV-activated pDC. We next validated the central role of the  $\text{NH}_3^+$  group by synthesizing an FFN-511 strict fluorescent analogue ( $\text{FC-CO}_2^-$ ), in which the ammonium ( $\text{NH}_3^+$ ) was replaced by a carboxylate function ( $\text{CO}_2^-$ ). In contrast to FFN-511,  $\text{FC-CO}_2^-$  did not show any inhibitory effect on pDC activation, highlighting an essential role for the  $\text{NH}_3^+$  function in the immunomodulatory activity of amines.

These monoamines and polyamines exhibited similar inhibitory effects on pDC, suggesting that they acted *via* one common receptor. Interestingly, spermine and spermidine prevent infection by X4 but not R5 HIV-1 strains, suggesting an interaction with the chemokine receptor CXCR4 (Wilkinson *et al.*). We evaluated the potential interaction between CXCR4 and amines. We report that CB induced CXCR4 internalization in pDC, and that FFN-511 strongly colocalized with CXCR4. Furthermore, CXCR4 silencing reverted CB inhibitory effect on pDC

activated with Flu or with X4 or R5 HIV-1. Altogether, our results demonstrated that CXCR4 is required by the amines to inhibit viral activation of pDC.

To evaluate the molecular interaction between amines and CXCR4, we performed *in silico* docking experiments. We identified a potential binding pocket for natural amines on the CXCR4 extracellular domain. The binding scores of natural and synthetic amines were in accordance with *in vitro* experiments and reinforced our hypothesis. Interestingly, this binding pocket overlapped with the one described for the CXCR4 antagonist AMD3100 (Donzella *et al.*, 1998). AMD3100 drastically reduced the inhibitory effect of CB on IFN-I and TRAIL mRNA expression by HIV-activated pDC, validating our docking model.

Our study provides new insights into the regulation of pDC activity by endogen molecules, opening new perspectives for the development of innovative therapeutic strategies. Indeed, pDC activation might be a double-edge sword for the host depending on the disease context, and its regulation represents a strategic issue in chronic infections, autoimmune diseases in which pDC are suspected to be hyperactive. For instance, increased IFN- $\alpha$  levels in the serum of SLE patients correlates with both disease activity and the expression of prognosis markers (Guiducci *et al.*, 2010). Pathologic over-activation of pDC and massive type I IFN production also leads to increased apoptotic ligand expression such as TRAIL. Inhibition of type I IFN-induced TRAIL expression may reduce symptoms in cutaneous lupus erythematosus by decreasing autoantibody production and autoimmune tissue injury (Zahn *et al.*, 2011). Moreover, pDC depletion showed a positive clinical impact in a mouse lupus model (Rowland *et al.*, 2014). TRAIL-dependent immune suppression during sepsis is deleterious and TRAIL neutralization might be a potential therapeutic target in septic patients (Gurung *et al.*, 2011). In addition, prolonged type I IFN production by pDCs could also have damaging consequences during infections. Two recent studies have illustrated this deleterious effect, demonstrating that IFN-I facilitates persistent infection and disease progression in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) (Teijaro *et al.*, 2013; Wilson *et al.*, 2013). To

summarize, amine-mediated type I IFN regulation has strong therapeutic potential in a variety of clinical situations where excessive amounts of this cytokine promote disease. These situations range from autoimmune diseases such as Lupus, which were shown to be driven by type I IFN (Banchereau and Pascual, 2006), *via* acute and chronic viral infections to various bacterial infections, where type I IFNs were shown to suppress antibacterial immune responses (Davidson *et al.*, 2015). Furthermore, viral-bacterial co-infections are a common complication of many viral infections including influenza, and one central mechanism of the facilitated bacterial outgrowth is type I IFN-mediated block of antibacterial responses (Davidson *et al.*, 2015). Lastly, the growing number of Mendelian disorders associated with excessive type I interferon and known as interferonopathies, such as the Aicardi-Goutieres syndrome (Crow, 2015), could be treated with small molecules reducing type I IFN production.

The role of type I IFN and pDC during HIV-1 infection remains complex (Miller and Bhardwaj, 2013). pDC largely contribute to the reduction of viral spread by producing important levels of IFNs (Schmidt *et al.*, 2005). However, the role of type I IFN in HIV may depend on the stage of the disease (Gougeon and Herbeuval, 2012). Although type I IFN have potent antiviral and immune stimulatory effect during acute infections, they could also have deleterious consequences in the long term (Fraietta *et al.*, 2013). During the course HIV infection, sustained IFN signaling contributes to chronic immune activation and pathogenesis (Li *et al.*, 2014; Moir *et al.*, 2011). Interestingly pDC from women produce significantly higher levels of IFN- $\alpha$  in response to HIV-1 than pDC from men, and that these higher levels of IFN- $\alpha$  lead to faster progression to AIDS (Meier *et al.*, 2009). Furthermore, Stary *et al.* showed that TRAIL-expressing killer pDC are implicated in apoptosis of CD4<sup>+</sup> T cells in tonsils from HIV-infected progressor patients (Stary *et al.*, 2009). Thus, blocking type I IFN during the chronic phase of HIV infection may be beneficial (Ries *et al.*, 2012).

In summary, our study establishes an essential link between natural amines and inhibition of the innate immune system. We demonstrate here that natural amines are efficient inhibitors of viral activation of pDC through CXCR4 engagement. We clearly identified CXCR4 as a potential “on/off” switch of pDC activity and placed this receptor as a new therapeutic target. Various pharmacological agents targeting CXCR4 are currently under clinical investigation (Debnath *et al.*, 2013), and could provide “ready-to-use” drugs to down-modulate pDC function and reduce type I IFN amounts. Compared to mAb-mediated type I IFN-blockade, this small-molecule approach may rapidly lead to economically *viable* treatments for a variety of unmet medical needs associated with excessive type I IFN production.

## **METHODS**

### **Blood samples, isolation and culture of blood leukocytes.**

Blood from healthy HIV-1-seronegative blood bank donors was obtained from “*Etablissement Français du Sang*” (convention # 07/CABANEL/106), Paris, France. Experimental procedures with human blood have been approved by Necker Hospital Ethical Committees for human research and were done according to the European Union guidelines and the Declaration of Helsinki. *In vitro* experiments were performed using human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated by density centrifugation from peripheral blood leukocyte separation medium (Cambrex, Gaithersburg, MD). pDC were purified by negative selection with the Human plasmacytoid DC enrichment kit (StemCell Technologies). Cells were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen, Gaithersburg, MD) containing 10% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT). After purification, we obtained purity higher than 91% for pDC.

### **Viral stimulation and infection.**

PBMC were seeded at  $1.10^6/1\text{mL}$  or purified pDC were seeded at  $5.10^4/100\mu\text{l}$  and then stimulated with the following viruses: inactivated AT-2 HIV-1<sub>MN</sub> (CXCR4 co-receptor specific) or AT-2 HIV-1<sub>ADA</sub> (CCR5 co-receptor specific) at 60 ng/mL p24<sup>CA</sup> equivalent (kindly provided by J.D. Lifson (SAIC-NCI, Frederick, MD)), Infectious human Influenza A/PR/8/34 virus (Flu), titer 1:8192 at dilution 1:1000 or DENV-2 16681 at MOI 10. Infectious HIV-1<sub>MN</sub> [tissue culture 50% infective dose (TCID50) = 106] and HIV-1<sub>ADA</sub> (TCID50 = 1,000) were used at the same concentration. Purified pDC were pre-treated with amino compounds for 1 hour, following overnight stimulation with virus. Supernatants were collected for cytokine detection. Microvesicles isolated from uninfected cell cultures matched to the culture to produce the virus were used as negative control (Mock).

### **Chemical compounds.**

Histamine dihydrochloride, clobenpropit dihydrobromide, dopamine, serotonin, spermine and spermidine (Sigma-Aldrich, MO,USA) were added in pDC culture at  $10\mu\text{M}$  in presence or absence of HIV-1. For histamine, *ex vivo* culture media (Lonza) was used in order to avoid histaminases. Fluorescent compounds FFN-511 and FC-CO<sub>2</sub><sup>-</sup> were synthesized as described in the supplementary material. Cells were pre-incubated 1 hour with AMD ( $20\mu\text{M}$ ) (Sigma-Aldrich, MO,USA) prior to CB, histamine or spermine incubation. pDC were cultured in the presence of 5mM of the oligodinucleotide A151 (TTAGGG)<sub>4</sub> ODN (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). The histamine receptors antagonists (pyrilamine/PYR for H1R, cimetidine/CIM for H2R, thioperamide/THIO for H3R and JNJ7777120/JNJ for H4R) (Sigma-Aldrich, MO,USA) were used at  $10\mu\text{M}$ .

### **CXCR4 knockout experiments.**

pDCs were seeded at  $10^5$  cells/mL in 96-well plates and incubated at 37°C. Small interfering RNA (siRNA) (Dharmacon) was diluted in DOTAP (Roche Applied Sciences). The mix was

gently mixed and incubated at room temperature during 15 minutes. After incubation, the mix was added to cells in culture at a final concentration of 160nM. Finally, cells were incubated at 37°C for 24 hours before adding the different virus overnight. Control was performed using a control siRNA.

### **Flow Cytometry.**

Cultured cells were incubated for 20 min at 4°C with appropriate antibodies Phycoerythrin (PE)-conjugated TRAIL clone RIK-2 (BD Bioscience, San Jose, CA), APC-conjugated BDCA-4, FITC-CD123 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany), PE-CXCR4 clone 12G5 (Biolegend, San Diego, CA) or with appropriate isotype-matched control antibodies (5µg/mL each) in PBS containing 2% mouse serum (Sigma, Saint Louis, MO) and FC-receptor blockers (BD Biosciences, San Jose, CA). Flow cytometry analysis was performed on a flow cytometry Canto II or LSR II flow cytometer using flow cytometry Diva software (BD Biosciences, San Jose, CA). FlowJo software (Treestar, Ashland, OR) was used to analyze data.

### **Cytokine detection.**

pDC's supernatants were tested for multispecies soluble IFN- $\alpha$  by ELISA (PBL Assay Science, NJ, USA) according to the manufacturer's instructions.

### **RT-qPCR analyses.**

Total RNA was extracted using RNeasy Mini kit and was submitted to DNase treatment (Qiagen), following manufacturer's instructions. RNA samples were converted to cDNA with RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Real-time PCR reactions were performed in duplicates using Takyon ROX SYBR MasterMix blue dTTP (Eurogentec) on a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Transcripts were quantified using the following program: 3 min at 95°C followed by 35 cycles of 15 s at

95°C, 25 s at 60°C and 25 s at 72°C. Values for each transcript were normalized to expression levels of RPL13A (60S ribosomal protein L13a) using the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. Primers used for quantification of transcripts by real time quantitative PCR are indicated below:

Gene	Forward Primer sequence (5' -> 3')	Reverse Primer sequence (5' -> 3')	Size
RPL13A	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA	126 bp
ACTB	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA	AAGGGACTTCCTGTAACAACG	140bp
TRAIL	GCTGAAGCAGATGCAGGACAA	TGACGGAGTTGCCACTTGACT	135bp
IFN- $\alpha$ 1/13 <sup>1</sup>	CCAGTTCAGAAAGGCTCCAG	TCCTCCTGCATCACACAGGC	174bp
IFN- $\alpha$ 4/10 <sup>2</sup>	CCCACAGCCTGGGTAATAGGA	CAGCAGATGAGTCCTCTGTGC	210bp
IFN- $\beta$	TGCATTACCTGAAGGCCAAGG	AGCAATTGTCCAGTCCCAGTG	152bp
IFN- $\lambda$ 1	GGACGCCTTGGAAGAGTCAC	CTGGTCTAGGACGTCCTCCA	187bp
IFN- $\lambda$ 2/3 <sup>3</sup>	GGCCTGTATCCAGCCTCAG	GAGGAGGCGGAAGAGGTTGA	146bp
IFN- $\gamma$	GGCAGCCAACCTAAGCAAGAT	CAGGGTCACTGACACATTCA	177bp
TNF- $\alpha$	GGCGTGGAGCTGAGAGATAAC	GGTGTGGGTGAGGAGCACAT	120bp
IL6	TAACCACCCCTGACCCAACC	ATTTGCCGAAGAGCCCTCAG	145bp
IL8	AAGGGCCAAGAGAATATCCGAA	ACTAGGGTTGCCAGATTTAACA	165bp
IL9	TGCACCAGACCATGCTTCAG	TTGCATGGCTGTTACAGGA	152bp
IL10	GGGCTTGGGGCTTCCTAACT	GCTGGCCACAGCTTTCAAGA	146bp
IL15	AAGAAGAGCTGGCTATGGCA	TCATGTTCCATGCTGCTGAC	142bp
ISG56	AGGACAGGAAGCTGAAGGAG	AGTGGGTGTTTCCTGCAAGG	159bp
CXCL10	CGCTGTACCTGCATCAGCAT	GCAATGATCTCAACACGTGGAC	107bp
iNOS	CAGCGGGATGACTTTCCAA	AGGCAAGATTTGGACCTGCA	75bp

1: Primers amplify both IFN- $\alpha$ 1 and IFN- $\alpha$ 13 transcripts

2: Primers amplify both IFN- $\alpha$ 4 and IFN- $\alpha$ 10 transcripts

3: Primers amplify both IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A) and IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B) transcripts.

### ***In vivo* treatment of mice.**

12 week old 129S8 mice (Jackson Laboratory), bred at the MRC-National Institute for Medical Research (NIMR) under specific pathogen-free conditions, were treated with Clobenpropit dihydrobromide (Sigma-Aldrich, C209) (450 $\mu$ g/30 $\mu$ L/mouse), Histamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich, H7250) (450 $\mu$ g/30 $\mu$ L/mouse) or Vehicle Control (PBS) (30 $\mu$ L/mouse) 18 hours prior to infection. Mice were infected with Influenza A virus strain X31 (H3N2) (a kind gift from Dr. J. Skehel, MRC-NIMR) at 800 TCID<sub>50</sub>/30 $\mu$ L. X31 was grown in the allantoic cavity



of 10 day-embryonated hen's eggs and was free of bacterial, mycoplasma, and endotoxin contamination, stored at  $-70^{\circ}$  and titrated on MDCK cells, according to the Spearman-Karber method. All mice were treated and infected intranasally (i.n) under light isoflurane-induced anaesthesia. At 3 days post infection mice were euthanized and bronchioalveolar lavage (BAL) fluid was collected. BAL samples were centrifuged at 1,300rpm, 5min at  $4^{\circ}\text{C}$  and supernatant collected. Samples were then analysed for concentrations of IFN $\alpha$ , (eBioscience) IFN $\beta$  (Biolegend UK) and IFN $\lambda$  (R&D) by ELISA as per the manufacturer's instructions.

### **Three dimensional microscopy.**

In some cases, purified pDC cells cultured overnight in presence of HIV-1 and with the different compounds (CB, FFN-511 and FC-CO $_2$ ). pDC ( $1 \times 10^5$  cells/slide) were plated on collagen-coated slides and fixed with paraformaldehyde 4%. Cells were then incubated with anti-CXCR4 antibody (Biolegend, San Diego, CA) in saturation buffer PBS-BSA 0,5% for membrane staining or in permeabilizing buffer containing 1% saponin with monoclonal antibody anti-TRAIL (Biolegend, San Diego, CA, USA). CXCR4 was revealed by a donkey anti-mouse IgG-AF647 (Molecular Probes, OR, USA) and TRAIL was revealed by a Donkey anti-mouse IgG-Cyanine 3 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Nucleus was stained using DAPI (Molecular Probes, Paisley, UK). Slides were mounted with Fluoromount-G (eBioscience, CA, USA) and scanned with a Nikon Eclipse 90i Upright microscope (Nikon Instruments Europe, Badhoevedorp, The Netherlands) using a 100x Plan Apo VC piezo objective (NA 1.4) and Chroma bloc filters (ET-DAPI, ET-GFP) and were subsequently deconvoluted with a Meinel algorithm and 8 iterations and analyzed using Metamorph® (MDS Analytical Technologies, Winnersh, UK). TRAIL / DAPI / Overlay / Confocal plane: Representative 2D focal plan. Overlay with bright: Bright. Reconvolution overlays: 2D projections of the maximum intensity pixels along the Z-axis.

In other cases, cells were cultured overnight in media alone then were washed in ice-cold PBS-BSA 0,2% and stained with CXCR4 antibody (R&D Systems) for 1 hour at 4°C. Cells were then washed with PBS-BSA 0,2% and stimulated with CB for 1 hour at 4°C. Data are expressed as the mean percentage  $\pm$  SEM mean channel fluorescence intensity (MFI) values for residual surface expression and intracellular staining. After staining in suspension, pDC ( $1 \times 10^5$  cells/slide) were spun for 10 min at 400rpm with a Shandon Cytospin® Cyto centrifuge (Thermo Scientific, St-Herblain, France) and fixed with paraformaldehyde 4%. Cells were then stained with secondary antibody anti-mouse-AF647 (Molecular Probes, OR, USA) either at the membrane or after permeabilization with Triton 0,2%. Finally, slides were washed in PBS, counterstained with Hoechst 33342 and mounted in Fluoromount-G medium. Images were digitally acquired with a Zeiss LSM 710 confocal Microscope using 63x PL APO O.N. =1,4/oil objective.

All analysis was performed using the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

### **Image Quantification**

7 pictures were taken from each slide for each Z section framing the nucleus. Quantification of the colocalization in the cytoplasm of purified pDC using Mander's Coefficient was obtain after analyze by JACoP plugging in ImageJ.

**Molecular modeling of CXCR4 with various ligands.** The molecular docking program cDOCKER was used for automated molecular docking simulations. PDB files were cleaned using the prepare protein protocol of Discovery Studio 4.0, membrane was added according to Im. W algorithm Ligands and their conformer were prepared using prepare ligand protocol after conformation generation. Complexes were selected on the basis of criteria of interacting energy combined with geometrical matching quality as well as compromise of scoring function Figures were generated with Discovery studio 4.0 graphics system. The 2D

representations of molecular structures interaction of Discovery Studio was used for delineation of the detailed interactions between ligands and CXCR4 (pdb code: 3ODU). An interaction was considered a hydrophobic interaction if the Van der Waals fraction was 0.7 and was considered a hydrogen bond if it was between a listed donor and acceptor and the angles and distances formed by the atoms surrounding the hydrogen bond lay within the default criteria.

### **Statistical analysis.**

P values (*P*) were determined using a two-tailed Student's *t* test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant. \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$  and \*\*\* =  $P < 0,001$ . Univariate distributions of flow cytometry data were performed by probability binning, in 300 bins using FlowJo software.

For mice data, data shown as the means  $\pm$ s.e.m. Sample sizes were designed to give statistical power, while minimizing animal use. Data sets were analysed by two-way ANOVA with Bonferroni post tests (cytokine concentration time courses). GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA) was used for data analysis and preparation of all graphs. P-values less than 0.01 were considered to be statistically significant.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Dr. Lucie Barblu for her technical help, Jean-Maurice Petit at the Central Service for Microscopy (SCM) of Paris Descartes University for technical assistance. We also thank Dr. Olivier Neyrolles's and his team and particularly Dr. Geanncarlo Lugo for technical discussion about siRNA in DC. This work was supported by SIDACTION and by the Agence National de la Recherche sur le SIDA et les Hépatites (ARNS), and by the Francis Crick Institute which receives its core funding from Cancer Research UK, the UK Medical Research Council (U117597139), and the Wellcome Trust (SD, AW).

## **COMPETING INTERESTS STATEMENT**

The authors declare that they have no competing financial interests.

## References

- 1 Grouard, G. *et al.* The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *The Journal of experimental medicine* **185**, 1101-1111 (1997).
- 2 Colonna, M., Trinchieri, G. & Liu, Y. J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* **5**, 1219-1226 (2004).
- 3 Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* **31**, 3388-3393 (2001).
- 4 Kadowaki, N. & Liu, Y. J. Natural type I interferon-producing cells as a link between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol* **63**, 1126-1132 (2002).
- 5 Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529-1531 (2004).
- 6 Heil, F. *et al.* Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526-1529 (2004).
- 7 Hemmi, H. *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-745 (2000).
- 8 Liu, Y. J. IPC: professional type I interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* **23**, 275-306 (2005).
- 9 Gandini, M. *et al.* Dengue Virus Activates Membrane TRAIL Relocalization and IFN-alpha Production by Human Plasmacytoid Dendritic Cells In Vitro and In Vivo. *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2257, doi:10.1371/journal.pntd.0002257 (2013).
- 10 Hardy, A. W., Graham, D. R., Shearer, G. M. & Herbeuval, J. P. HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN-alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 17453-17458, doi:10.1073/pnas.0707244104 (2007).
- 11 Stary, G. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4+ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients. *Blood* **114**, 3854-3863 (2009).
- 12 Drobits, B. *et al.* Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *J Clin Invest* **122**, 575-585, doi:10.1172/JCI61034 (2012).
- 13 Banchereau, J. & Pascual, V. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* **25**, 383-392, doi:10.1016/j.immuni.2006.08.010 (2006).
- 14 Pascual, V., Farkas, L. & Banchereau, J. Systemic lupus erythematosus: all roads lead to type I interferons. *Current opinion in immunology* **18**, 676-682, doi:10.1016/j.coi.2006.09.014 (2006).
- 15 Benlahrech, A. & Patterson, S. HIV-1 infection and induction of interferon alpha in plasmacytoid dendritic cells. *Curr Opin HIV AIDS* **6**, 373-378, doi:10.1097/COH.0b013e328349592a (2011).
- 16 Davidson, S., Crotta, S., McCabe, T. M. & Wack, A. Pathogenic potential of interferon alphabeta in acute influenza infection. *Nat Commun* **5**, 3864, doi:10.1038/ncomms4864 (2014).
- 17 Cao, W. *et al.* Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)K-mTOR-p70S6K pathway. *Nat Immunol* **9**, 1157-1164, doi:10.1038/ni.1645 (2008).
- 18 Blomberg, S., Eloranta, M. L., Magnusson, M., Alm, G. V. & Ronnblom, L. Expression of the markers BDCA-2 and BDCA-4 and production of interferon-alpha by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **48**, 2524-2532, doi:10.1002/art.11225 (2003).

- 19 Zhang, M., Borovikova, L. V., Wang, H., Metz, C. & Tracey, K. J. Spermine inhibition of monocyte activation and inflammation. *Mol Med* **5**, 595-605 (1999).
- 20 Perez-Cano, F. J., Franch, A., Castellote, C. & Castell, M. Immunomodulatory action of spermine and spermidine on NR8383 macrophage line in various culture conditions. *Cell Immunol* **226**, 86-94, doi:10.1016/j.cellimm.2003.09.009 (2003).
- 21 Mazzoni, A. et al. Cutting edge: histamine inhibits IFN-alpha release from plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* **170**, 2269-2273 (2003).
- 22 Gschwandtner, M., Mommert, S., Kother, B., Werfel, T. & Gutzmer, R. The histamine H4 receptor is highly expressed on plasmacytoid dendritic cells in psoriasis and histamine regulates their cytokine production and migration. *J Invest Dermatol* **131**, 1668-1676, doi:10.1038/jid.2011.72 (2011).
- 23 Bufe, A., Gehlhar, K., Grage-Griebenow, E. & Ernst, M. Atopic phenotype in children is associated with decreased virus-induced interferon-alpha release. *International archives of allergy and immunology* **127**, 82-88, doi:48173 (2002).
- 24 Gubernator, N. G. et al. Fluorescent false neurotransmitters visualize dopamine release from individual presynaptic terminals. *Science* **324**, 1441-1444 (2009).
- 25 Gras, C. et al. TRAIL protein localization in human primary T cells by 3D microscopy using 3D interactive surface plot: a new method to visualize plasma membrane. *J Immunol Methods* **387**, 147-156, doi:10.1016/j.jim.2012.10.008 (2013).
- 26 Pegg, A. E. Toxicity of polyamines and their metabolic products. *Chemical research in toxicology* **26**, 1782-1800, doi:10.1021/tx400316s (2013).
- 27 Pritschet, K. et al. CD4- and dynamin-dependent endocytosis of HIV-1 into plasmacytoid dendritic cells. *Virology* **423**, 152-164, doi:10.1016/j.virol.2011.11.026 (2012).
- 28 Smith, N., Etheve-Quellejeu, M. & Herbeuval, J. P. CD4 and Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Ligand (TRAIL) localization in HIV-stimulated plasmacytoid dendritic cells by three-dimensional microscopy. *AIDS research and human retroviruses* **30**, 1158-1159, doi:10.1089/aid.2014.0125 (2014).
- 29 Rosenkilde, M. M. et al. Molecular mechanism of AMD3100 antagonism in the CXCR4 receptor: transfer of binding site to the CXCR3 receptor. *J Biol Chem* **279**, 3033-3041, doi:10.1074/jbc.M309546200 (2004).
- 30 Fitzgerald-Bocarsly, P. & Jacobs, E. S. Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection: striking a delicate balance. *J Leukoc Biol* **87**, 609-620, doi:10.1189/jlb.0909635 (2010).
- 31 Herbeuval, J. P. & Shearer, G. M. HIV-1 immunopathogenesis: how good interferon turns bad. *Clinical immunology* **123**, 121-128, doi:10.1016/j.clim.2006.09.016 (2007).
- 32 Wilkinson, R. A. et al. Novel compounds containing multiple guanide groups that bind the HIV coreceptor CXCR4. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 255-263, doi:10.1128/AAC.00709-10 (2011).
- 33 Donzella, G. A. et al. AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med* **4**, 72-77 (1998).
- 34 Guiducci, C. et al. TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus. *Nature* **465**, 937-941, doi:10.1038/nature09102 (2010).
- 35 Zahn, S. et al. Interferon-alpha stimulates TRAIL expression in human keratinocytes and peripheral blood mononuclear cells: implications for the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. *Br J Dermatol* **165**, 1118-1123, doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10479.x (2011).
- 36 Rowland, S. L. et al. Early, transient depletion of plasmacytoid dendritic cells ameliorates autoimmunity in a lupus model. *The Journal of experimental medicine* **211**, 1977-1991, doi:10.1084/jem.20132620 (2014).
- 37 Gurung, P. et al. Immune unresponsiveness to secondary heterologous bacterial infection after sepsis induction is TRAIL dependent. *J Immunol* **187**, 2148-2154, doi:10.4049/jimmunol.1101180 (2011).

- 38 Wilson, E. B. *et al.* Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science* **340**, 202-207, doi:10.1126/science.1235208 (2013).
- 39 Teijaro, J. R. *et al.* Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science* **340**, 207-211, doi:10.1126/science.1235214 (2013).
- 40 Davidson, S., Maini, M. K. & Wack, A. Disease-promoting effects of type I interferons in viral, bacterial, and coinfections. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **35**, 252-264, doi:10.1089/jir.2014.0227 (2015).
- 41 Crow, Y. J. Type I interferonopathies: mendelian type I interferon up-regulation. *Current opinion in immunology* **32**, 7-12, doi:10.1016/j.coi.2014.10.005 (2015).
- 42 Miller, E. & Bhardwaj, N. Dendritic cell dysregulation during HIV-1 infection. *Immunological reviews* **254**, 170-189, doi:10.1111/imr.12082 (2013).
- 43 Schmidt, B., Ashlock, B. M., Foster, H., Fujimura, S. H. & Levy, J. A. HIV-infected cells are major inducers of plasmacytoid dendritic cell interferon production, maturation, and migration. *Virology* **343**, 256-266 (2005).
- 44 Gougeon, M. L. & Herbeuval, J. P. IFN-alpha and TRAIL: A double edge sword in HIV-1 disease? *Exp Cell Res* **318**, 1260-1268, doi:10.1016/j.yexcr.2012.03.012 (2012).
- 45 Fraietta, J. A. *et al.* Type I interferon upregulates Bak and contributes to T cell loss during human immunodeficiency virus (HIV) infection. *PLoS pathogens* **9**, e1003658, doi:10.1371/journal.ppat.1003658 (2013).
- 46 Moir, S., Chun, T. W. & Fauci, A. S. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol* **6**, 223-248, doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130254 (2011).
- 47 Li, G. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells suppress HIV-1 replication but contribute to HIV-1 induced immunopathogenesis in humanized mice. *PLoS pathogens* **10**, e1004291, doi:10.1371/journal.ppat.1004291 (2014).
- 48 Meier, A. *et al.* Sex differences in the Toll-like receptor-mediated response of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1. *Nat Med* (2009).
- 49 Ries, M., Pritschet, K. & Schmidt, B. Blocking type I interferon production: a new therapeutic option to reduce the HIV-1-induced immune activation. *Clin Dev Immunol* **2012**, 534929, doi:10.1155/2012/534929 (2012).
- 50 Debnath, B., Xu, S., Grande, F., Garofalo, A. & Neamati, N. Small molecule inhibitors of CXCR4. *Theranostics* **3**, 47-75, doi:10.7150/thno.5376 (2013).

## Materials and Methods Supplemental Data

### Chemical compound synthesis.

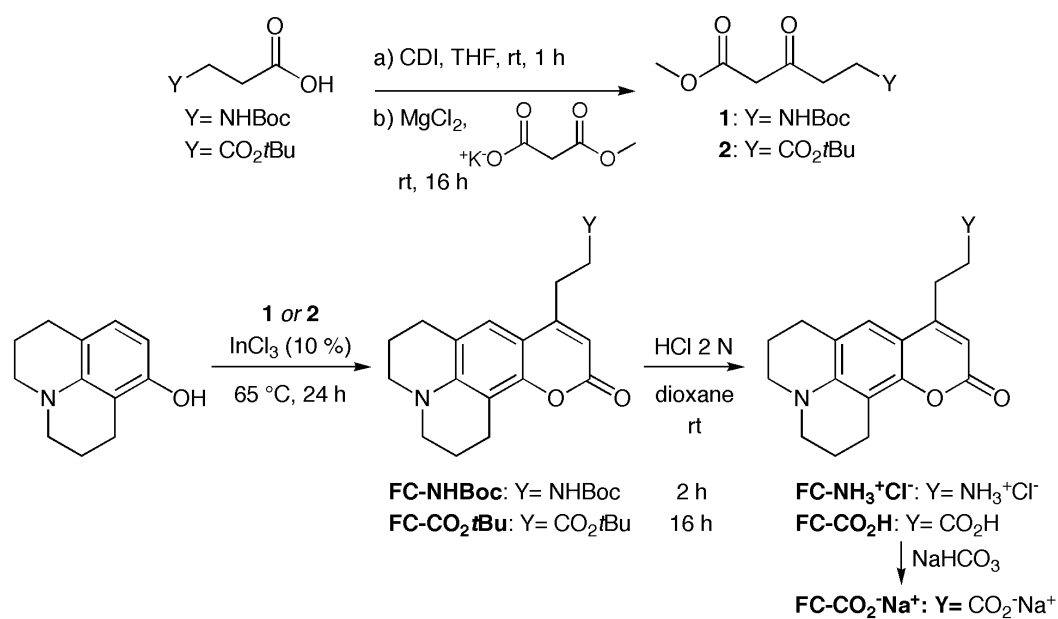
#### General methods

Tetrahydrofuran (THF) was distilled from sodium/benzophenone, immediately prior to use and stored under an argon atmosphere. 8-Hydroxyjulolidine, mono-*tert*-butyl succinate, potassium hydrogen methyl malonate, anhydrous dimethylformamide (DMF), ether and dioxane were purchased from Aldrich. *N-tert*-Butyloxycarbonyl- $\beta$ -alanine was synthesized following literature procedure (Salmon-Chemin et al., 2001).

All reactions were carried out under argon atmosphere, and were monitored by thinlayer chromatography with Merck 60F-254 precoated silica (0.2 mm) on glass. Flash chromatography was performed with Merck Kieselgel 60 (200–500  $\mu$ m); the solvent systems were given v/v.  $^1\text{H}$ NMR (500 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) spectra were recorded on a Bruker AVANCEII-500 spectrometer. Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in ppm. The multiplicities are abbreviated as follows: s=singlet, d=doublet, t=triplet, m=multiplet, brs=broad singlet.  $^{13}\text{C}$  chemical attributions were assigned using  $^1\text{H}$ -decoupled spectra. Mass spectra were recorded on a Thermo Finnigan LCD Advantage spectrometer. Spectroscopic ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, MS) and/or analytical data were obtained using chromatographically homogeneous samples.

The synthesis of compounds **FC-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>**, **FC-CO<sub>2</sub>H** was achieved according to the following scheme:





## Procedures and Characterization of Products

### General Procedure A: Masamune-Claisen type condensation (Kralj *et al.*, 2009)

1,1'-Carbonyldiimide (5.84 g, 36 mmol, 1.2 equiv) was added slowly to a solution of *N*-Boc- $\beta$ -alanine (5.68 g, 30 mmol, 1 equiv) *or* mono-*tert*-butyl succinate (5.23 g, 30 mmol, 1 equiv) in anhydrous THF (100 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. A well homogenized powdered solid mixture of MgCl<sub>2</sub> (2.74 g, 28.8 mmol, 0.96 equiv) and potassium hydrogen methyl malonate (7.03 g, 45 mmol, 1.5 equiv) was then added and the reaction mixture was stirred overnight. After evaporation of the solvent, EtOAc (100 mL) was added and the mixture was washed with 1 M aqueous NaHSO<sub>4</sub> (3 x 30 mL) and brine (30 mL). The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc) to give 6.55 g (89%) of **1** as a colorless oil [*R*<sub>f</sub> = 0.3 (cyclohexane/EtOAc: 7/3)] *or* 5.87 g (85%) of **2** as a colorless oil [*R*<sub>f</sub> = 0.3 (cyclohexane/EtOAc: 8/2)]. Spectral data of the  $\beta$ -keto esters **1** and **2** were in agreement with the literature data (Guzzo and Miller, 1994; Hashiguchi *et al.*, 1992; Moreau and Sorensen, 2007).

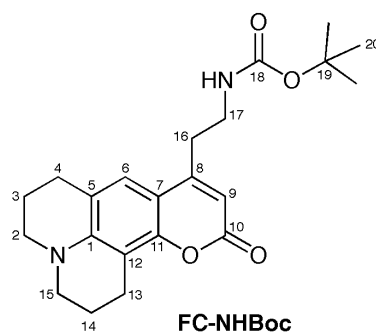
### General Procedure B: Pechmann condensation (Gubernator *et al.*, 2008)

A mixture of  $\beta$ -keto ester **1** (1 equiv) *or* **2** (1 equiv), 8-hydroxyjulolidine (1 equiv) and  $\text{InCl}_3$  (0.1 equiv) was heated at 65 °C for 24 h. The cooled mixture was dissolved in  $\text{CHCl}_3$ , washed with water, dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography on silica gel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ ).

### General Procedure C: Removal of the *t*-butyl group

At 0 °C, to compound **FC-NHBoc** *or* **FC-CO<sub>2</sub>tBu** was added 2 M HCl (20 equiv/*t*-Bu) in dioxane. The reaction mixture was then stirred at room temperature for 2–16 h and evaporated to dryness.

**(2,3,5,6-Tetrahydro-1*H*,4*H*-10-oxo-11-oxa-3*a*-aza-benzo[*de*]anthracen-8-ylethylamino) methanoate *tert*-butyl ester (FC-NHBoc).** Following the *general procedure B*,  $\beta$ -keto ester **1** (981.1 mg, 4.0 mmol), 8-hydroxyjulolidine (757.0 mg, 4.0 mmol) and  $\text{InCl}_3$  (85.6 mg, 0.4 mmol) yielded the title compound (800 mg, 52%) as a bright yellow solid; m.p. 78°C; [ $R_f$  = 0.32 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ : 9/1)].

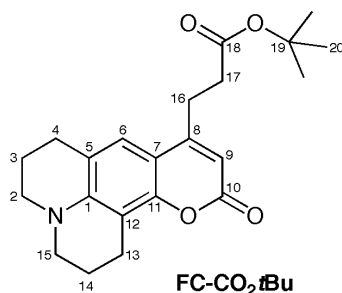


$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.0 (s, 1H, H-6), 5.84 (s, 1H, H-9), 4.72 (brs, 1H, NH), 3.38 (m, 2H, H-17), 3.21 (m, 4H, H-2, H-15), 2.83 (m, 4H, H-13, H-16), 2.73 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 2H, H-4), 1.92 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 4H, H-3, H-14), 1.40 (s, 9H, H-20);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  162.5 (C-10), 155.9 (C-18), 154.0 (C-8), 151.6 (C-11), 146.1 (C-1), 121.7 (C-6), 118.3 (C-5), 108.0 (C-7), 107.9 (C-9), 107.1 (C-12), 79.7 (C-19), 50.1 (C-2), 49.7 (C-15), 39.9 (C-17), 32.5 (C-16), 28.6 (C-20), 27.9 (C-4), 21.7, 20.8, 20.6 (C-3, C-13, C-14); MS,  $m/z$  (%):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  = 385.5 (100%).

**tert-Butyl**

**(2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-10-oxo-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-8-ylethyl)**

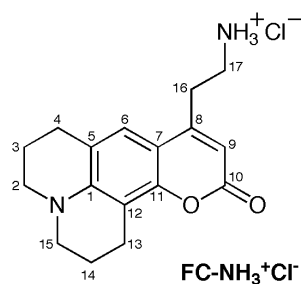
**methanoate (FC-CO<sub>2</sub>tBu).** Following the *general procedure B*,  $\beta$ -keto ester **2** (691.0 mg, 3.0 mmol), 8-hydroxyjulolidine (567.8 mg, 3.0 mmol) and InCl<sub>3</sub> (66.4 mg, 0.3 mmol) yielded the title compound (832.0 mg, 75%) as a yellow solid; m.p. 129 °C; [*R*<sub>f</sub> = 0.34 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc: 95/5)].



<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  6.90 (s, 1H, H-6), 5.76 (s, 1H, H-9), 3.15 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, H-2), 3.12 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H-15), 2.83 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-16), 2.75 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H-13), 2.67 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, H-4), 2.48 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-17), 1.85 (m, 4H, H-3, H-14), 1.36 (s, 9H, H-20); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  171.3 (C-18), 162.1 (C-10), 155.0 (C-8), 151.1 (C-11), 145.7 (C-1), 121.1 (C-6), 118.0 (C-5), 107.6 (C-7), 106.8 (C-12), 106.7 (C-9), 80.8 (C-19), 49.8 (C-2), 49.3 (C-15), 33.8 (C-17), 28.0 (C-20), 27.7 (C-4), 26.6 (C-16), 21.5 (C-3), 20.6, 20.4 (C-13, C-14); MS, *m/z* (%): [M+H]<sup>+</sup> = 370.1 (100%).

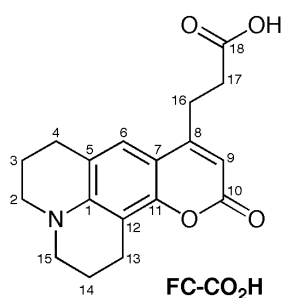
**8-(2-Aminoethyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-10-one.**

**HCl (FC-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>).** The title compound was prepared following the *general procedure C* from **FC-NHBoc** (192.2 mg, 0.5 mmol) after stirring for 2 h. Ether was then added to the residue and the precipitate was filtered. The precipitate was taken up in water and filtered then the filtrate was lyophilized to furnish **FC-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>** (154.0 mg, 96%) as a yellow solid.



$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  8.22 (brs, 3H,  $\text{NH}_3^+$ ), 7.27 (s, 1H, H-6), 5.93 (s, 1H, H-9), 3.26 (t,  $J$ = 5.5 Hz, 2H, H-2), 3.24 (t,  $J$ = 5.5 Hz, 2H, H-15), 3.14-2.88 (m, 4H, H-16, H-17), 2.74 (t,  $J$ = 6.0 Hz, 2H, H-4), 2.72 (t,  $J$ = 6.5 Hz, 2H, H-13), 1.88 (m, 4H, H-3, H-14);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO):  $\delta$  160.6 (C-10), 152.1 (C-8), 150.8 (C-11), 145.6 (C-1), 121.6 (C-6), 117.9 (C-5), 107.5 (C-9), 106.7 (C-7), 105.7 (C-12), 49.2, 48.6 (C-2, C-15), 37.9 (C-17), 28.8 (C-16), 27.0 (C-4), 20.9, 20.1, 20.0 (C-3, C-13, C-14); MS,  $m/z$  (%):  $[\text{M}-\text{Cl}]^+=$  285.1 (100%).

**(2,3,5,6-Tetrahydro-1H,4H-10-oxo-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-8-yl) propionic acid (FC-CO<sub>2</sub>H)**. The title compound was prepared following the *general procedure C* from **FC-CO<sub>2</sub>tBu** (184.6 mg, 0.5 mmol) after stirring overnight. The residue was purified by flash chromatography on silica gel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 100 to  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ : 9/1) to yield **FC-CO<sub>2</sub>H** (139.5 mg, 89%) as a yellow solid; m.p. 144–146 °C; [ $R_f$ = 0.17 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ : 95/5)].

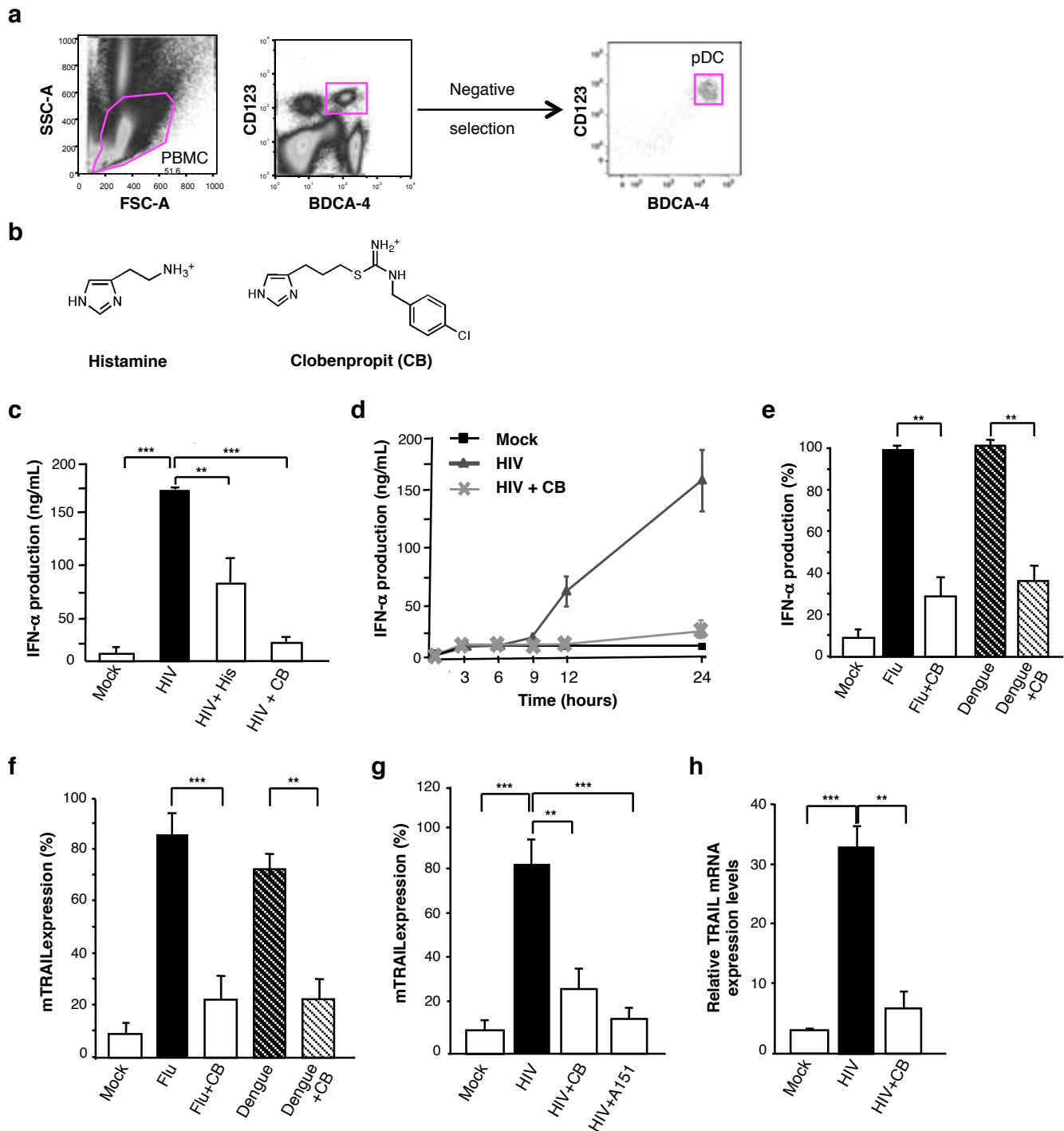


$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.96 (s, 1H, H-6), 5.83 (s, 1H, H-9), 3.20 (m, 4H, H-2, H-15), 2.95 (t,  $J$ = 7.5 Hz, 2H, H-16), 2.83 (t,  $J$ = 6.5 Hz, 2H, H-13), 2.73 (t,  $J$ = 6.5 Hz, 2H, H-4), 2.63 (t,  $J$ = 7.5 Hz, 2H, H-17), 1.93 (m, 4H, H-3, H-14);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  172.7 (C-18), 162.5 (C-10), 154.8 (C-8), 151.4 (C-11), 146.0 (C-1), 121.2 (C-6), 118.3 (C-5), 107.8 (C-7), 107.1 (C-12), 107.0 (C-9), 50.1 (C-2), 49.6 (C-15), 32.7 (C-17), 27.9 (C-4), 26.7 (C-16), 21.7 (C-3),

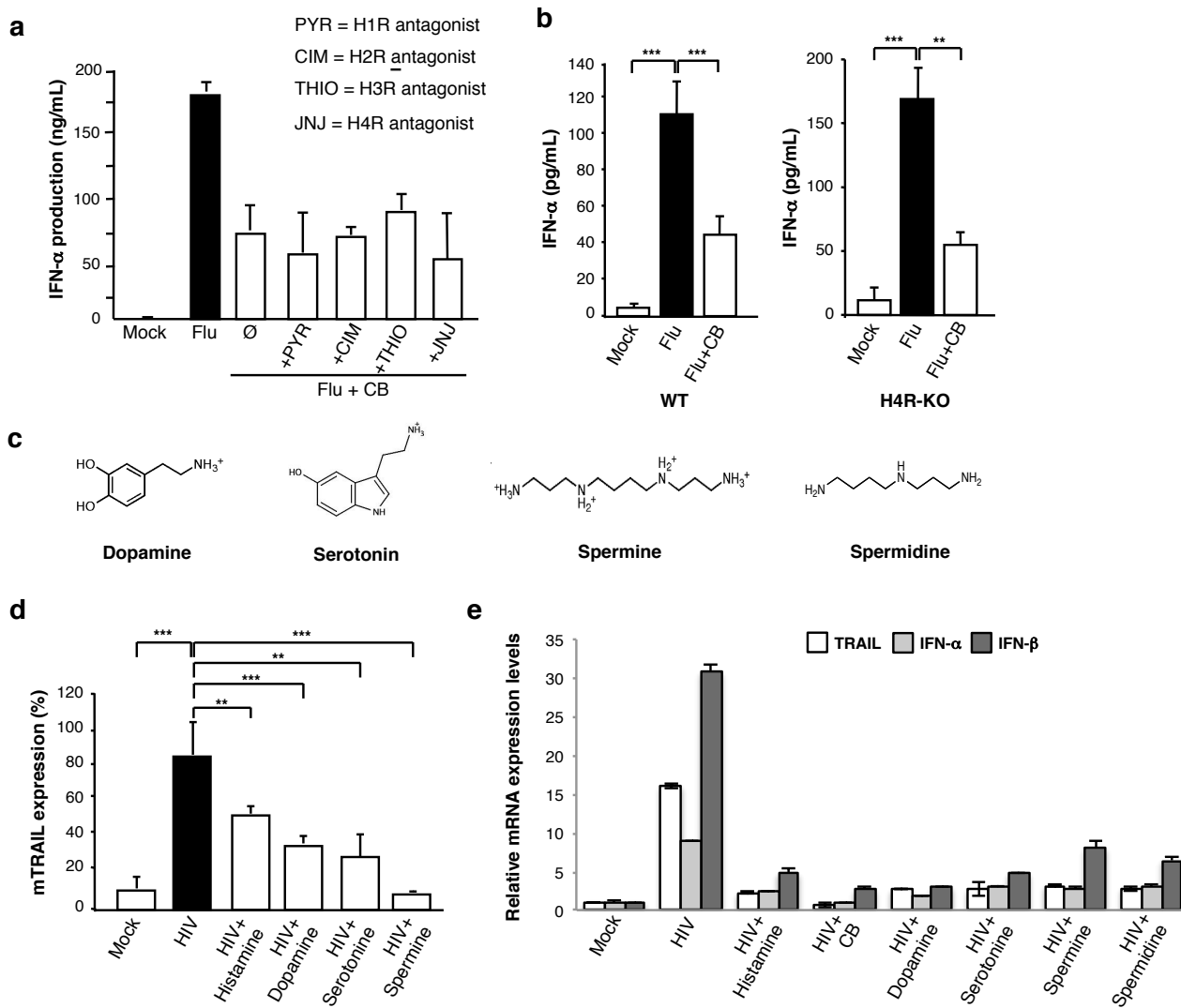
20.8, 20.6 (C-13, C-14); MS, m/z (%): [M+H]<sup>+</sup>= 314.1 (100%); [M-H]<sup>-</sup>= 312.0 (100%), [M-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>= 268.1 (50%).

**FC-CO<sub>2</sub>H** was converted as its carboxylate sodium salt for water solubility: To **FC-CO<sub>2</sub>H** in CHCl<sub>3</sub> under vigorous stirring was carefully added a 5% aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> (0.95 equiv). After decantation the aqueous phase was lyophilized to yield **FC-CO<sub>2</sub>Na<sup>+</sup>**.

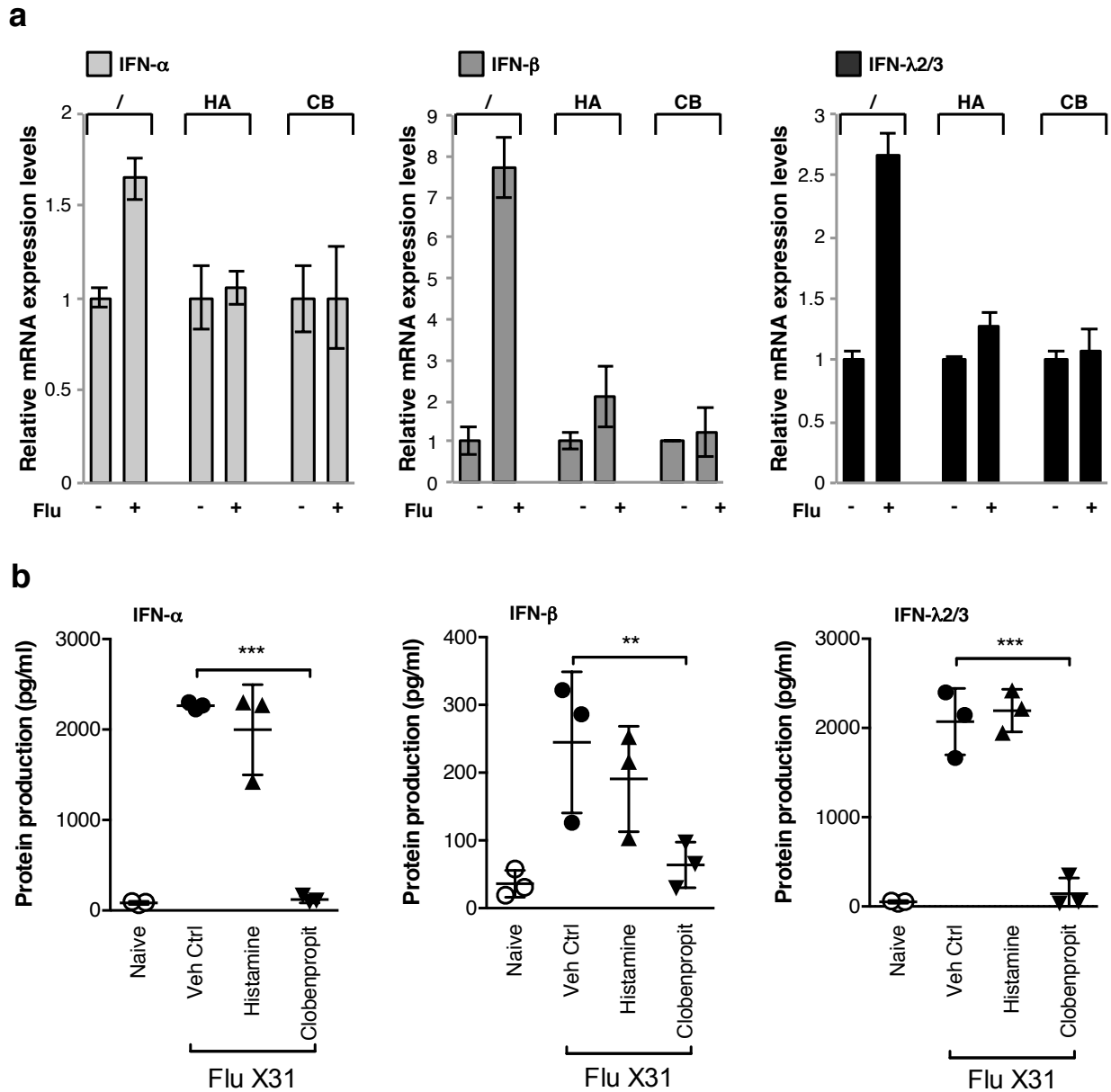
- 1 Salmon-Chemin, L. *et al.* 2-and 3-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Synthesis and correlation between redox cycling activities and in vitro cytotoxicity. *J Med Chem* **44**, 548-565, doi:Doi 10.1021/Jm001079I (2001).
- 2 Kralj, D. *et al.* A synthesis of 1-substituted 5-[2-(acylamino)ethyl]-1H-pyrazole-4-carboxamides. *Tetrahedron* **65**, 7151-7162, doi:Doi 10.1016/J.Tet.2009.06.021 (2009).
- 3 Moreau, R. J. & Sorensen, E. J. Classical carbonyl reactivity enables a short synthesis of the core structure of acutumine. *Tetrahedron* **63**, 6446-6453, doi:Doi 10.1016/J.Tet.2007.03.024 (2007).
- 4 Hashiguchi, S., Kawada, A. & Natsugari, H. Bakers-Yeast Reduction of N-Protected Methyl 4-Amino-3-Oxobutanoates and 4-Amino-3-Oxopentanoates. *Synthesis-Stuttgart*, 403-408 (1992).
- 5 Guzzo, P. R. & Miller, M. J. Catalytic, Asymmetric-Synthesis of the Carbacephem Framework. *J Org Chem* **59**, 4862-4867, doi:Doi 10.1021/Jo00096a031 (1994).
- 6 Gubernator, N. G., Sames, S., Sulzer, D. & Vadola, P. Fluorescent substrates for monoamine transporters as optical false neurotransmitters. US patent (2008).



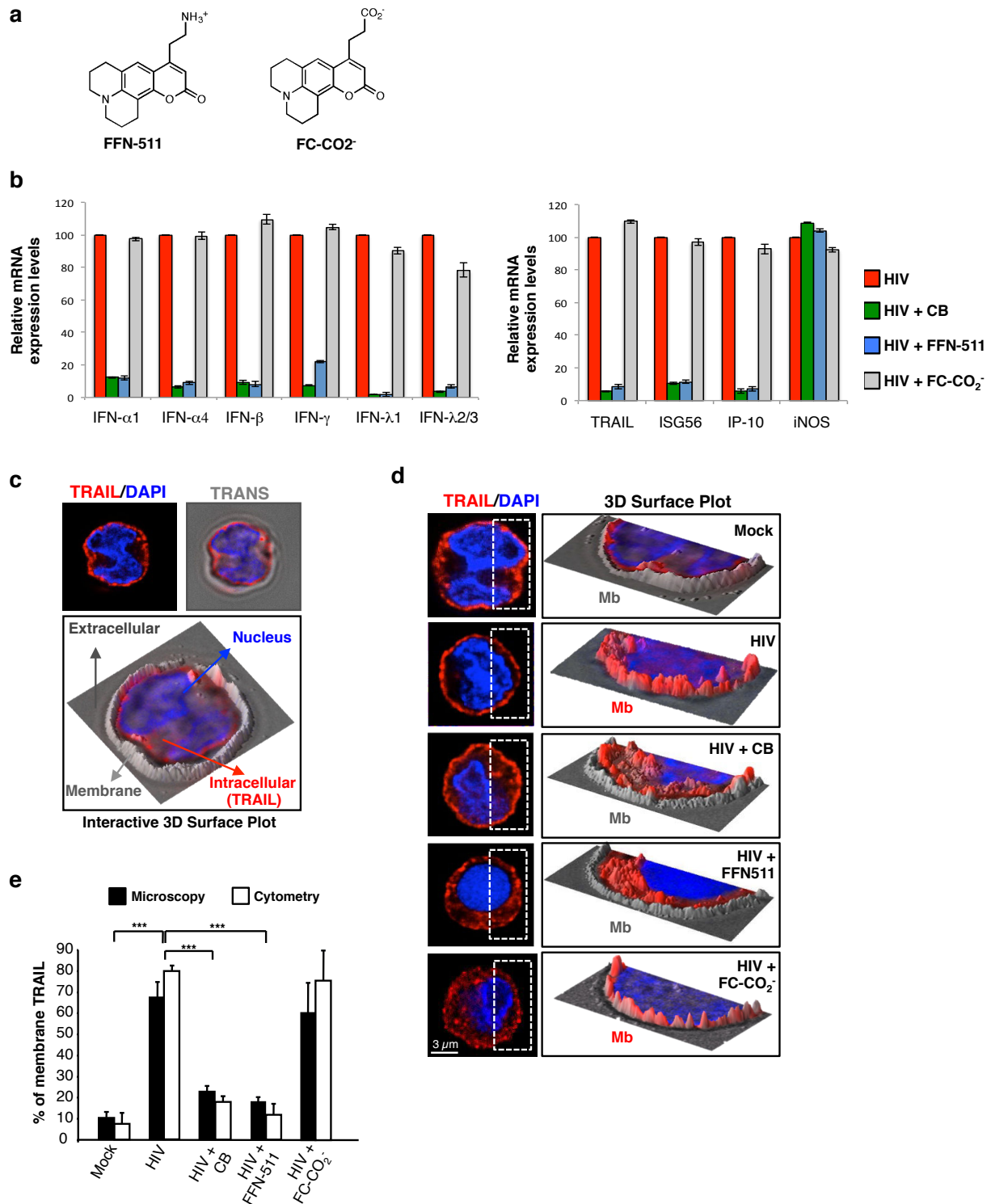
**Fig. 1.** Histamine and Clobenpropit inhibit purified HIV-stimulated pDC activation. **(a)** pDC were acquired by flow cytometry before and after purification from PBMC of healthy donors. Negative selection was used to obtain purity higher than 90% in all experiments. **(b)** Chemical structures of histamine and clobenpropit (CB). **(c)** Isolated pDC were pretreated with Histamine or with CB at the concentration of 10 $\mu$ M and then stimulated with microvesicles (mock) alone or with HIV overnight. IFN- $\alpha$  was measured in the supernatants by Elisa. N=3; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001 **(d)** IFN- $\alpha$  production overtime in supernatants of purified pDC cultured overnight with microvesicles (mock) alone or with HIV alone or together with CB at the concentration of 10 $\mu$ M. Production of IFN- $\alpha$  by Elisa in supernatants **(e)** or expression of membrane TRAIL at the surface of the cells by flow cytometry **(f)** from purified pDC pre-incubated with CB and then cultured overnight with Influenza A or Dengue viruses. N=3; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001 **(g)** Levels of membrane TRAIL were assessed by flow cytometry on purified pDC after pre-incubation with CB or the specific TLR7 antagonist, A151, and then overnight HIV stimulation. N=3; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001 **(h)** mRNA levels of TRAIL from purified pDC pre-incubated with CB (10 $\mu$ M) and stimulated overnight with HIV, were measured by RT-qPCR and normalized to RPL13A. Data shown are representative of three independent experiments.



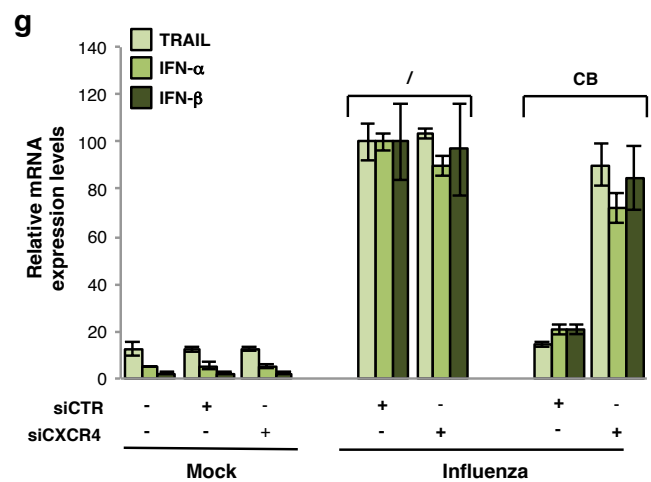
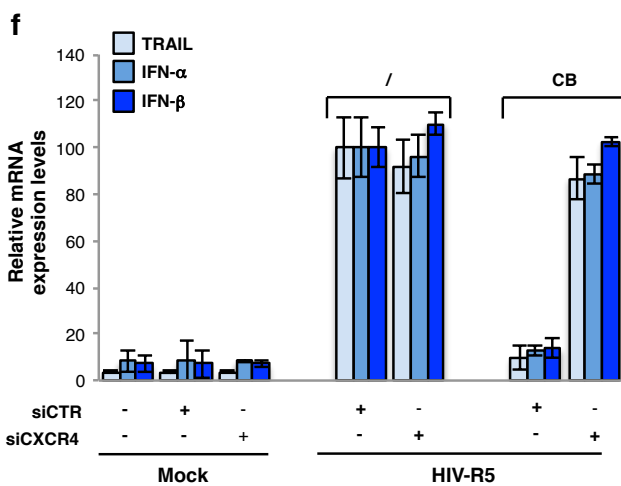
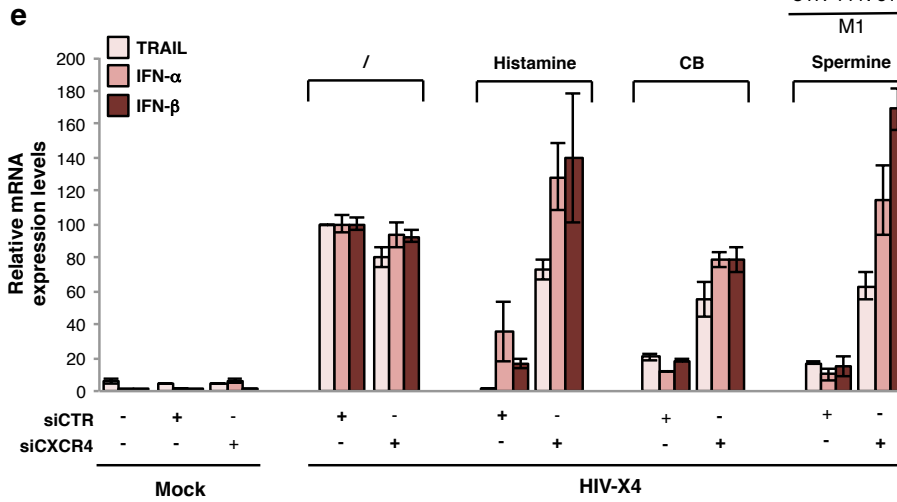
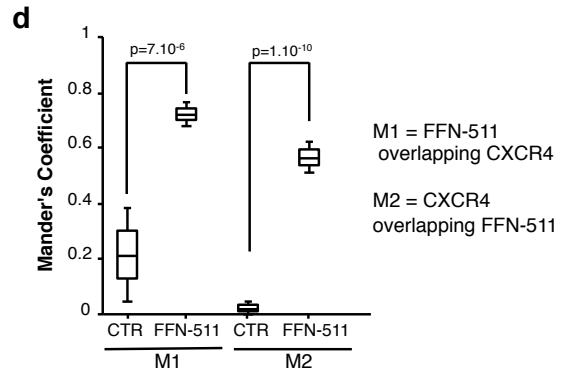
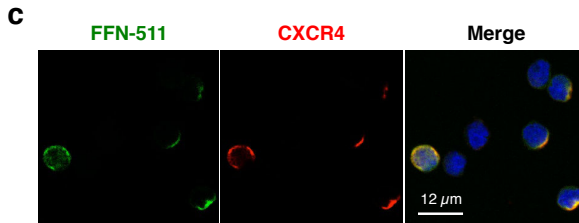
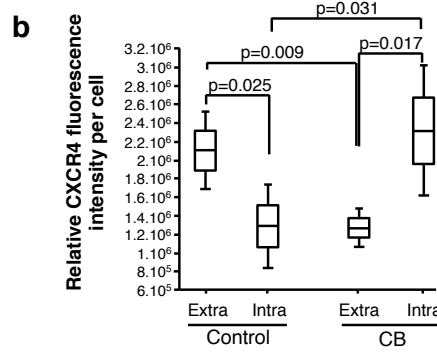
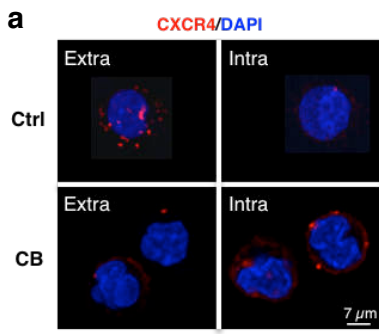
**Fig. 2.** Histamine receptors are not involved in the inhibition of stimulated pDC. **(a)** Isolated pDC were pretreated with various Histamine receptors inhibitors, pyridylethylamine (H1R), cimetidine (H2R), thioperamide (H3R) and JNJ7777120 (H4R) at 50 $\mu$ M, and then treated with CB before overnight stimulation with Influenza A virus. IFN- $\alpha$  was quantified in the supernatants by Elisa. **(b)** Mouse MNC were obtained from the spleen using a homogenizer and purified using a 35% isotonic Percoll density gradient (Amersham Biosciences). Spleen MNC were depleted of RBC using red cell lysis buffer (8.3 mg/mL NH<sub>4</sub>Cl, 1 mg/mL KHCO<sub>3</sub>, and 3.72  $\mu$ g/mL EDTA put in Mat and Med). Wild type (WT) (n=14) or H4RKO mice (n=10) spleen MNC were pre-incubated with CB (10 $\mu$ M) and then cultured overnight with Influenza A virus. IFN- $\alpha$  was quantified in the supernatants by ELISA. N=5 ; \*\* : p< 0,01; \*\*\* : p<0,001 **(c)** Chemical structures of histamine, dopamine, serotonin, spermine and spermidine. **(d)** Levels of membrane TRAIL were assessed by flow cytometry on purified pDC after pre-incubation with histamine, dopamine, serotonin, spermine and spermidine then overnight HIV stimulation. N=3 ; \*\* : p< 0,01; \*\*\* : p<0,001. P values (p) were determined using a two-tailed Student's *t* test. **(e)** mRNA levels of TRAIL and IFN-( $\alpha$ ,  $\beta$ ) from purified pDC pre-incubated with histamine, CB, dopamine, serotonin, spermine and spermidine and stimulated overnight with HIV, were measured by RT-qPCR and normalized to RPL13A. Data shown are representative of three independent experiments.



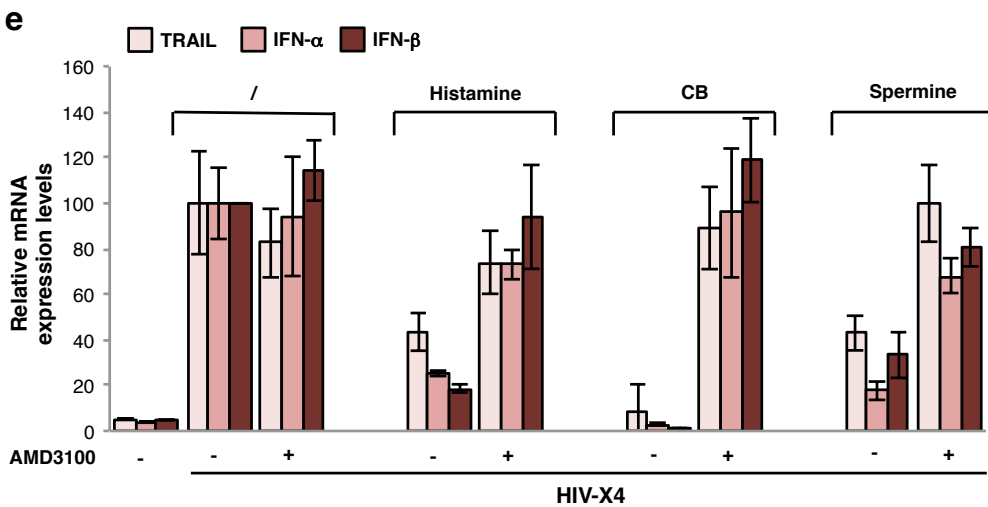
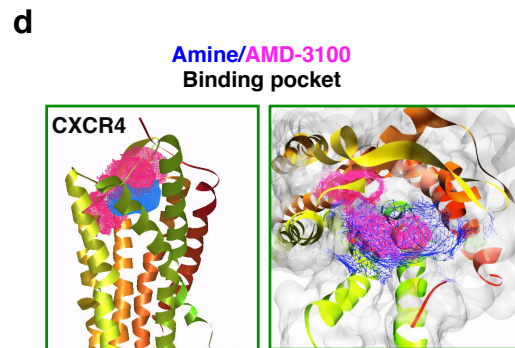
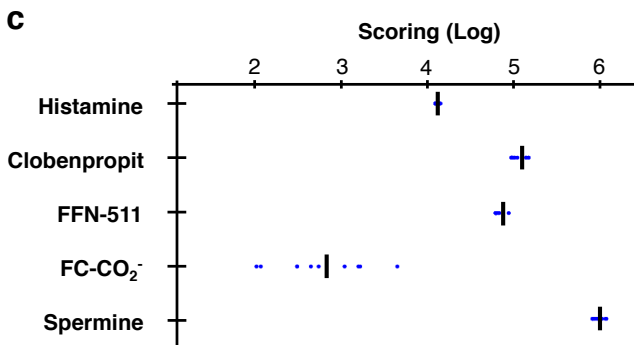
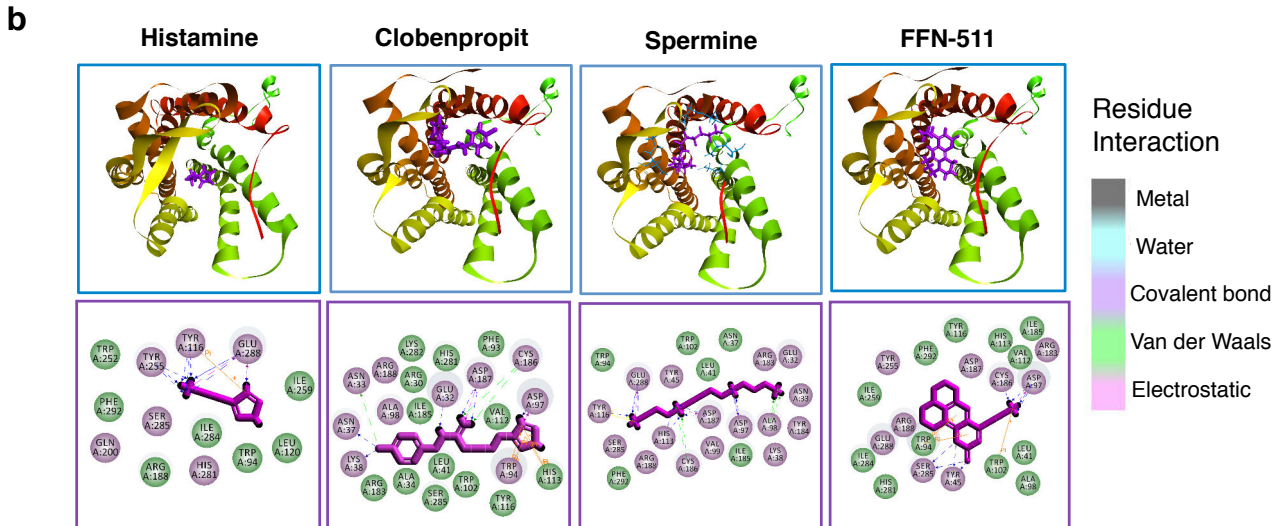
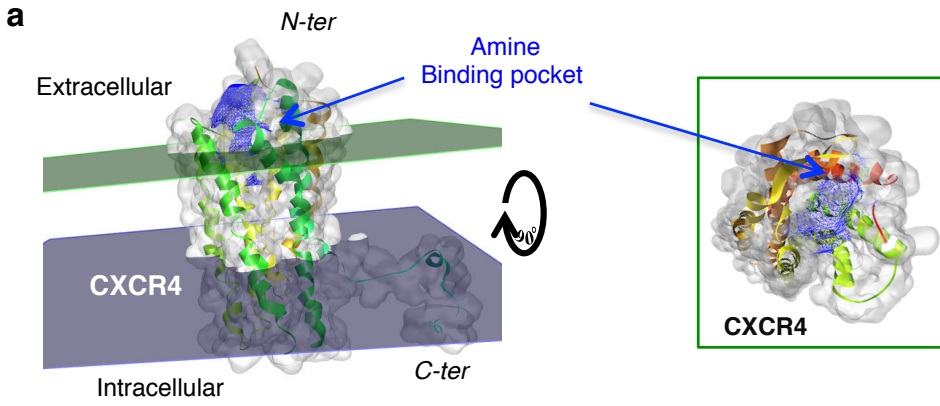




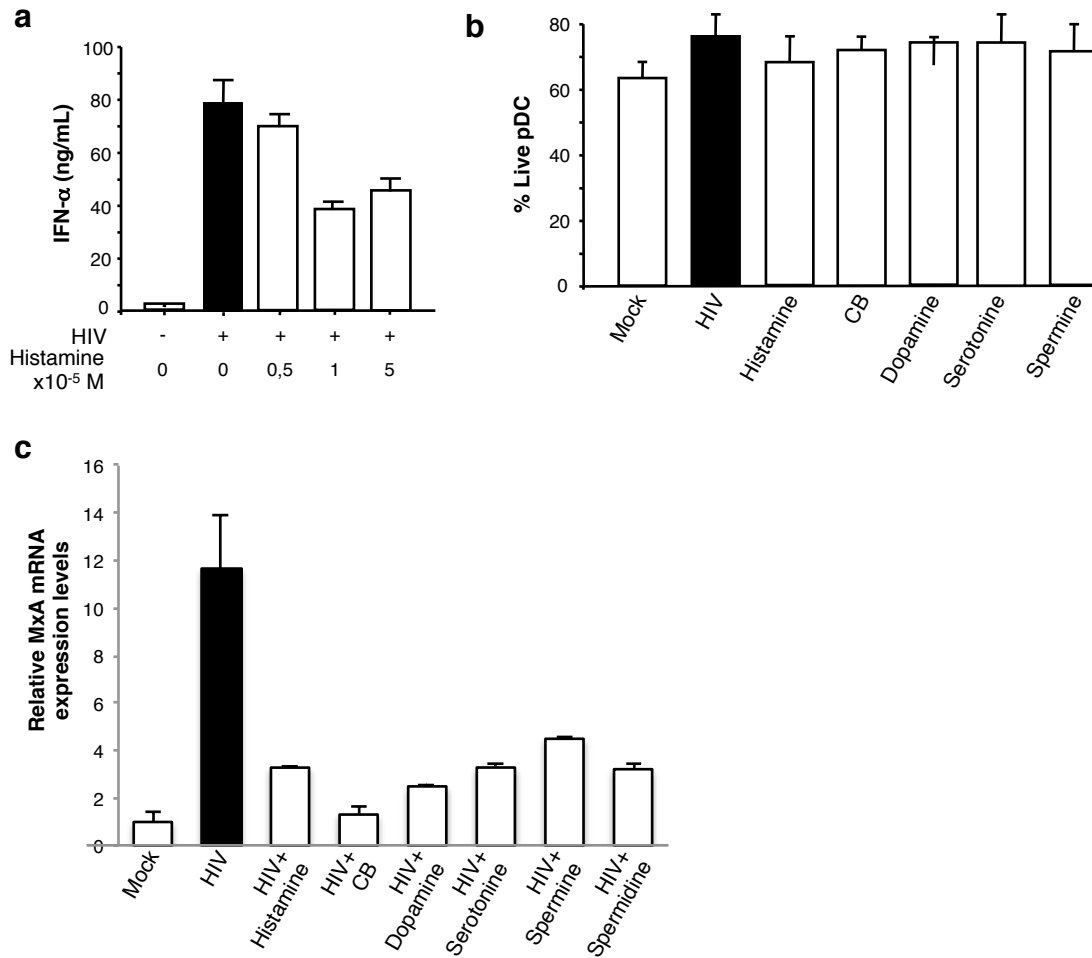
**Fig. 4.** The  $\text{NH}_3^+$  function is essential for inhibitory effect on pDC. **(a)** Chemical structures of FFN-511 and  $\text{FC-CO}_2^-$ . **(b)** mRNA levels of TRAIL, IFN-( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\lambda 1$ ,  $\lambda 2/3$ ), TNF- $\alpha$ , IL-(6, 8, 9, 10), ISG56, IL-15 and iNOS from purified pDC pre-incubated with CB, FFN-511 or  $\text{FC-CO}_2^-$  (10 $\mu\text{M}$ ) and stimulated overnight with HIV, were measured by RT-qPCR and normalized to RPL13A. **(c)** Study of TRAIL expression by three dimensions (3D) microscopy (left panel) and 3D interactive surface plot of pDC using bright light (right panel). Cell is stained with DAPI (blue) and TRAIL (red). Plasma membrane is in grey relief. **(d)** Epifluorescence at three dimensions (3D) microscopy (left panels) of purified pDC after pre-incubation with CB, FFN-511 or  $\text{FC-CO}_2^-$  (10 $\mu\text{M}$ ) and overnight stimulation with HIV. Cells were then stained with anti-TRAIL (red) and mounted with Fluoromount G with DAPI (blue). Scale bar, 3 $\mu\text{m}$ . 3D interactive surface plot (right panels) were then acquired after ImageJ analysis. **(e)** Comparison between the 3D microscopy and flow cytometry method to quantify the percentage of membrane TRAIL of pDC after the different stimulations. P values ( $p$ ) were determined using a two-tailed Student's  $t$  test.  $N=3$ ; \*\*\*:  $p<0,001$



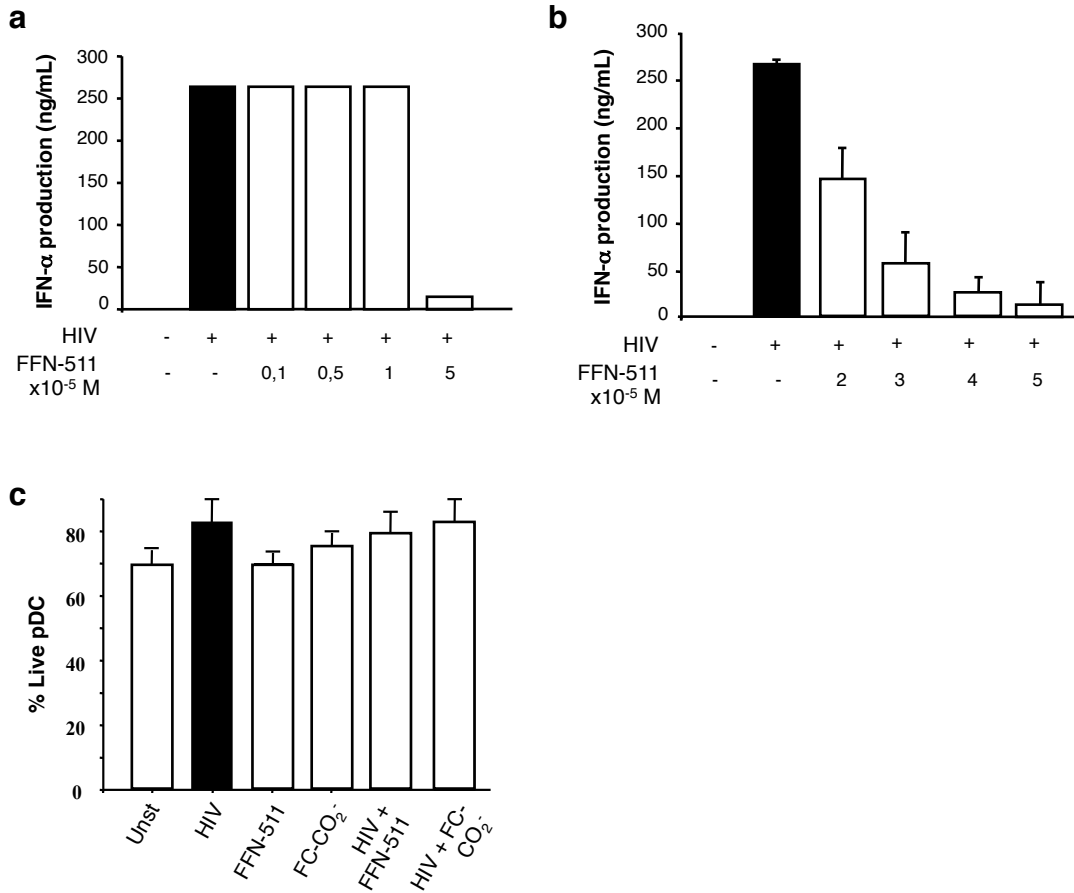
**Fig. 5.** The mechanism of CB inhibitory effect on HIV-stimulated pDC requires the binding to the chemokine receptor CXCR4. **(a)** Confocal microscopy of purified pDC was performed to assess the internalization of CXCR4. Cells were incubated with 12G5 (anti-CXCR4) antibody at 4°C before treatment with CB. The cells were stained with secondary antibody before or after being fixed and permeabilized with Saponin, to observe extracellular or intracellular CXCR4 expression respectively. All cells were then mounted with Fluoromount G with DAPI (blue). Scale bar, 7µm. **(b)** Quantification of the intensity of fluorescence to allow the localization of CXCR4 at the membrane or in the cytoplasm of 15 purified pDC after treatment or not. **(c)** Confocal microscopy of purified pDC after pre-incubation with FFN-511 (green). Cells were then stained with anti-CXCR4 (12G5) (red) and mounted with Fluoromount G with DAPI (blue). Scale bar, 12µm. **(d)** Quantification of the colocalization between CXCR4 and FFN-511 in the cytoplasm of 20 purified pDC. Mander's Coefficient were obtain after analysis by JACoP plugging in ImageJ. M1 represents FFN-511 overlapping CXCR4 and M2 represents CXCR4 overlapping FFN-511. **(e), (f) and (g)** pDC were treated for 24h with a siRNA CXCR4 (siCXCR4) or a siRNA Control (siCTR) at 160nM. Cells were pre-incubated with histamine, CB or spermine (10µM) and then stimulated with HIV X4 **(e)**, HIV R5 **(f)** or Influenza A virus **(g)**. mRNA levels of TRAIL, IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  from those cells were then quantified by RT-qPCR. Data shown are representative of three independent experiments.



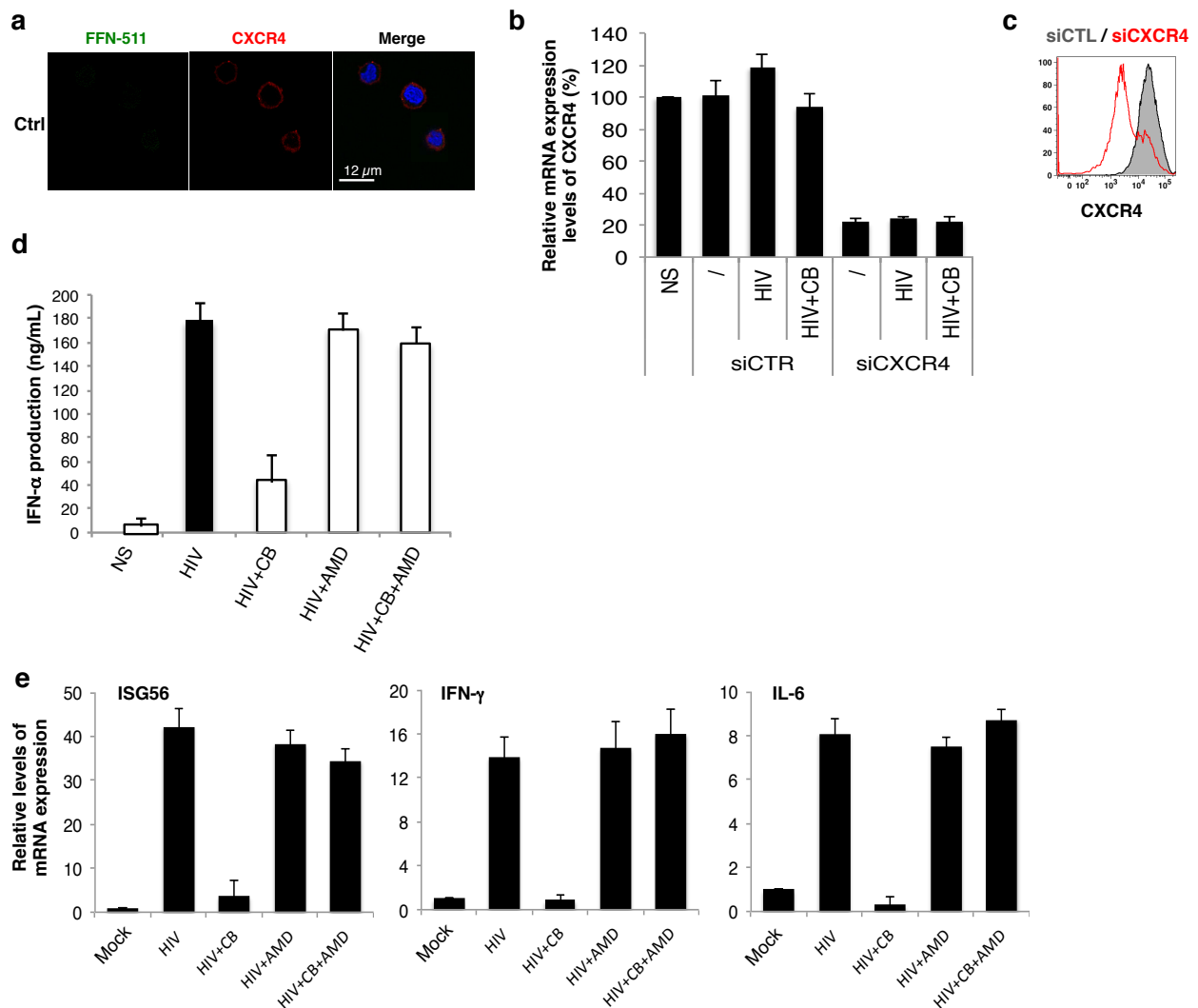
**Fig. 6.** The ammonium compounds bind in a pocket of the extracellular domain of CXCR4. **(a)** Overall structure of CXCR4 (left panel) (based on the crystallography structure – PDB code 3ODU). The 7-transmembrane domain is represented by the green helices. The membrane is represented in green and grey. The right panel represents a top view of CXCR4 (extracellular side), allowing the view of the ligand-binding pocket (blue). **(b)** Docking of the different small molecules (Histamine, CB, FFN-511 and Spermine - purple) into the allosteric binding pocket of CXCR4 (top panels). From the previous docking, a two-dimension diagram between defined ligand and binding site residue of CXCR4 was performed (bottom panels). The different interactions between the compounds and the residues of CXCR4 are represented according to a color code (grey: metal, blue: water, purple: covalent bond, green: van der Waals and pink: electrostatic). **(c)** Score table establishing the force of the interaction between the ligands and the binding pocket of CXCR4. **(d)** Side view (left panel) and top view (right panel) of CXCR4 (extracellular side), allowing the view of the ligand-binding pocket (blue) and the binding site of the well-described CXCR4 antagonist, AMD-3100 (magenta). **(e)** mRNA levels of TRAIL, IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  from purified pDC pre-incubated with AMD-3100 (20 $\mu$ M) then histamine, CB or spermine (10 $\mu$ M) and stimulated overnight with HIV-X4, were measured by RT-qPCR and normalized to RPL13A. Data shown are representative of three independent experiments.



**Supplemental Fig. 1.** Natural amines inhibit pDC activation and are not toxic to pDC. (a) IFN- $\alpha$  was measured in supernatants of isolated pDC pretreated with histamine at the different concentrations and then stimulated with HIV overnight. (b) Viability assessed by the trypan blue method after 24h on pDC in culture with histamine, clobenpropit (CB), dopamine, serotonin and spermine at the concentrations of 10 $\mu$ M. (c) mRNA levels of MxA from purified pDC pre-incubated histamine, CB, dopamine, serotonin, spermine and spermidine and stimulated overnight with HIV, were measured by RT-qPCR and normalized to RPL13A. Data shown are representative of three independent experiments.



**Supplemental Fig. 2.** FFN-511 inhibits pDC activation and the synthetic compounds are not toxic to pDC. (a) IFN- $\alpha$  was measured in supernatants of isolated pDC pretreated with FFN- 511 at the different concentrations and then stimulated with HIV overnight. (b) IFN- $\alpha$  was quantified in supernatants of purified pDC after pre-incubation with FFN-511 at various concentrations and then stimulation overnight with HIV. (c) Viability assessed by the trypan blue method of pDC in culture with FFN-511 and FC-CO<sub>2</sub> - at the concentrations of 50 $\mu$ M stimulated or not overnight with HIV.



**Supplemental Fig. 3.** CXCR4 has a role in the amine effect on pDC. (a) Confocal microscopy of purified pDC. Cells were then fixed with formaldehyde, blocked with 0,5% BSA, stained with anti-CXCR4 (12G5) (red) and mounted with Fluoromount G with DAPI (blue). Scale bar, 12 $\mu$ m. (b) mRNA levels of CXCR4 from purified pDC treated for 24h with a siRNA CXCR4 (siCXCR4) or a siRNA Control (siCtr) at 160nM and then pre-incubated with CB (10 $\mu$ M) and stimulated with HIV, were assessed by RT-qPCR and normalized to RPL13A. Data shown are representative of three independent experiments. (c) Levels of membrane CXCR4 from purified pDC treated for 24h with a siRNA CXCR4 (siCXCR4) or a siRNA Control (siCtr) at 160nM and then pre-incubated with CB (10 $\mu$ M) and stimulated with HIV were assessed by flow cytometry. (d) IFN- $\alpha$  was measured by ELISA in supernatants of isolated pDC pretreated with AMD3100 (20 $\mu$ M), then CB and stimulated with HIV overnight. (e) mRNA levels of ISG56, IFN- $\gamma$  and IL-6 from purified pDC pre-incubated with AMD-3100 (20 $\mu$ M) then CB (10 $\mu$ M) and stimulated overnight with HIV, were measured by RT-qPCR and normalized to RPL13A. Data shown are representative of three independent experiments.





## ARTICLE N°2

### Méthode efficace de régulation des protéines par ARN interférence dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes humaines primaires

Nikaïa Smith, Sébastien Nisole, Jean-Philippe Herbeuval

#### Manuscrit en écriture

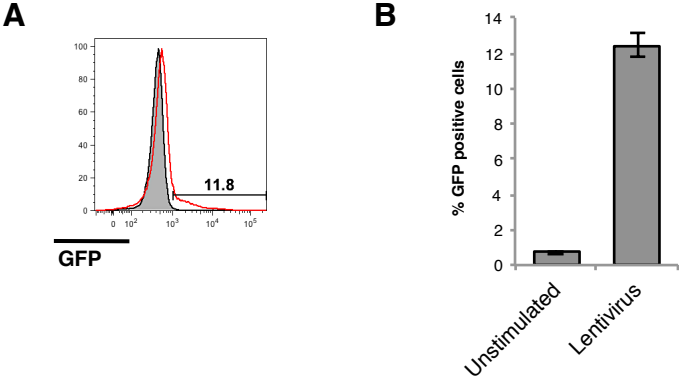
**Introduction:** Différents agents de transfection ainsi que différentes méthodes physique pour faire entrer les RNA interférents (siRNA) ont été développés ces dernières années. On peut citer notamment l'électroporation avec AMAXA largement utilisé pour transfecter des lymphocytes primaires, l'Hiperfect qui est un agent lipidique élaboré en raison de sa faible toxicité et le JetPrime un poly-éthylèneimine qui capture l'ARN et forme des endosomes dans la cellule avant d'exploser pour le relarguer dans le cytoplasme. Les pDC sont des cellules rares (moins de 1% des PBMC) et fragiles, qui ne peuvent pas être gardés en culture plus de 48h. Malgré une recherche active et une grande amélioration, les protocoles cités prennent rarement en compte les facteurs qui influencent une transfection efficace dans les pDC comme le nombre de cellules, l'efficacité de la transfection, l'impact sur la viabilité cellulaire, l'inhibition de l'expression de la protéine et l'activation minimale non spécifique. En effet, les pDC expriment TLR7 qui reconnaît les ARN. Ainsi, la transfection de siRNA non modifiés peut activer les pDC. La transfection de pDC primaires représente ainsi un véritable challenge technologique.

**Méthode:** Les pDC sont purifiées par tri magnétique (sélection négative) à partir de PBMC du sang de donneurs sains. La viabilité, le pourcentage de transfection et l'inhibition de la protéine cible d'un siRNA qui cible la cyclophiline B ont alors été testés avec différents agents de transfection. Les siRNA TLR7, IRF7 et CXCR4 ont aussi été évalués ainsi que leur effet sur des pDC primaires après différentes stimulations virales.

**Résultats:** Nous avons montré que le DOTAP est l'agent de transfection le plus efficace de tout point de vue : il n'induit pas de mortalité, transfecte de façon efficace et induit la diminution de la protéine cible. D'autre part, nous avons montré qu'avec cette technique il est possible d'inhiber efficacement des protéines de l'immunité des pDC comme IRF7, TLR7 mais aussi des protéines ubiquitaires comme CXCR4 et que toute la signalisation en aval de la protéine était bien inhibée. D'autre part, nous avons aussi montré que le siRNA n'affectait pas la fonctionnalité intrinsèque des pDC. En effet, des pDC transfectées avec du siRNA CXCR4 sont capables d'être activées par divers virus.

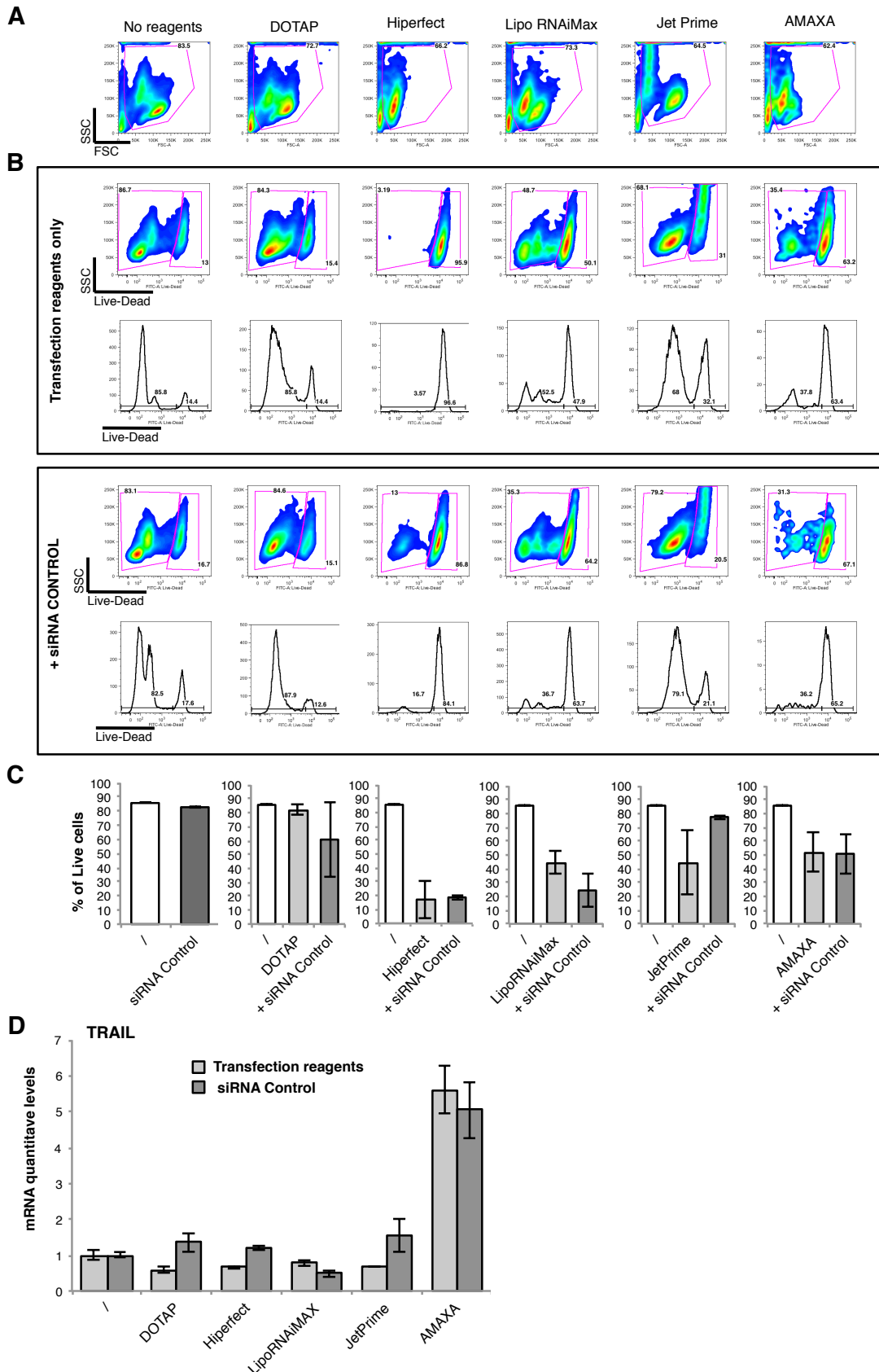


**Figure 1 : Lentivirus**



**Figure 1:** pDC get really poorly infected by lentivectors. pDC were cultured with GFP-lentivectors with a VSVg envelope for 48h and then the GFP positive cells were quantified by FACS (A) and (B). (B) represents the average of three independent experiments.

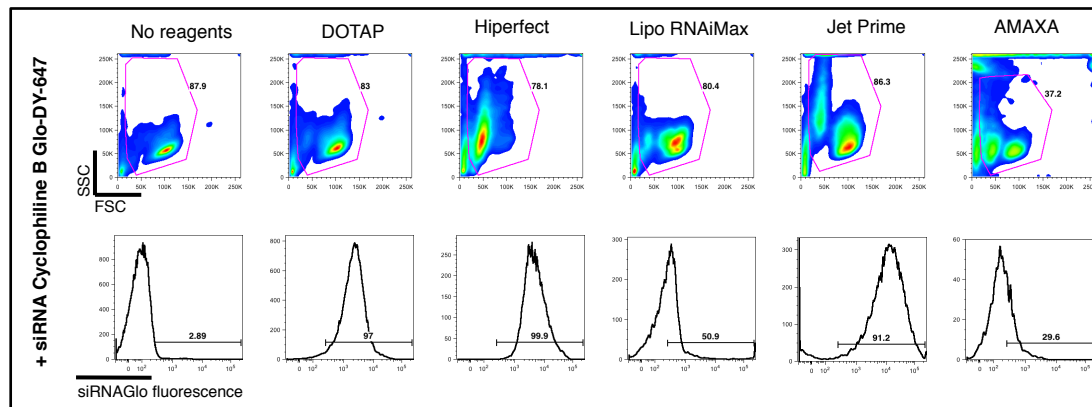
**Figure 2 : Percentage of death and activation**



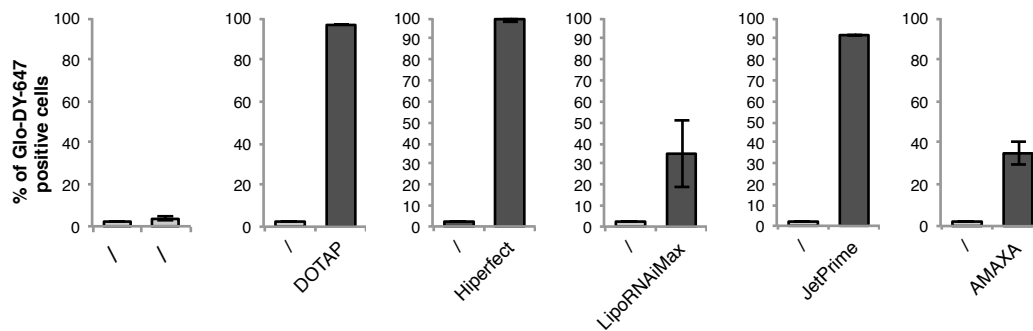
**Figure 2:** Comparison of the different transfection reagents (DOTAP, Hiperfect, LipoRNAiMax, JetPrime and Nucleofactor AMAXA) on pDC's viability and on their activation. Purified pDC were cultured for 4 hours with the different reagents alone or complexed with the siRNA SCRAMBLE. (A) The size (FSC) and granularity (SSC) of the cells were evaluated by FACS. (B) Purified pDC were stained with the LIVE/DEAD Green Dead Cell Stain Kit for 30min in order to evaluate the viability of the cells in presence of the reagents alone (top panels) or with the reagents complexed with the siRNA SCRAMBLE. (C) The histogram represents the average of the percentage of live cells of 3 independent experiments. (D) mRNA levels of TRAIL from purified pDC cultured for 4 hours with the different reagents alone or complexed with the siRNA Control were measured by RT-qPCR and normalized to RPL13A.

**Figure 3 : Percentage of siRNA transfection et downregulation**

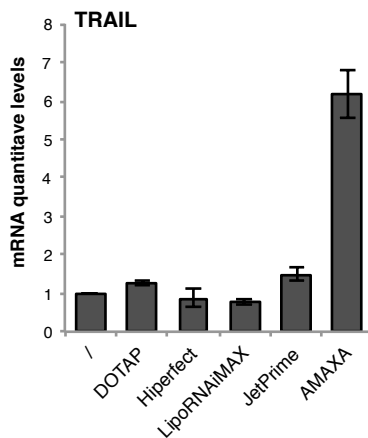
**A**



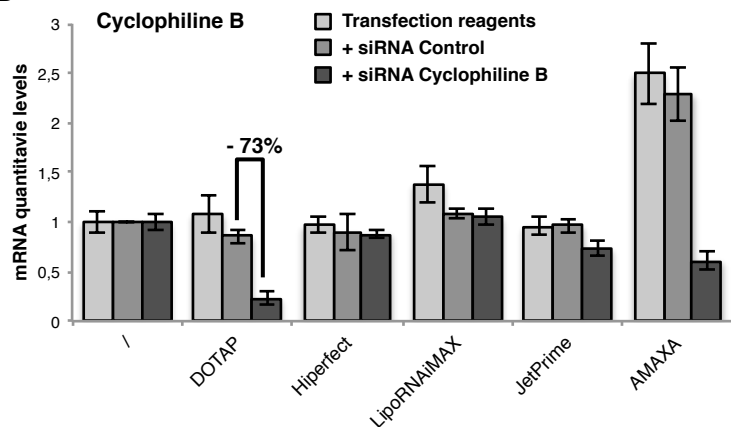
**B**



**C**

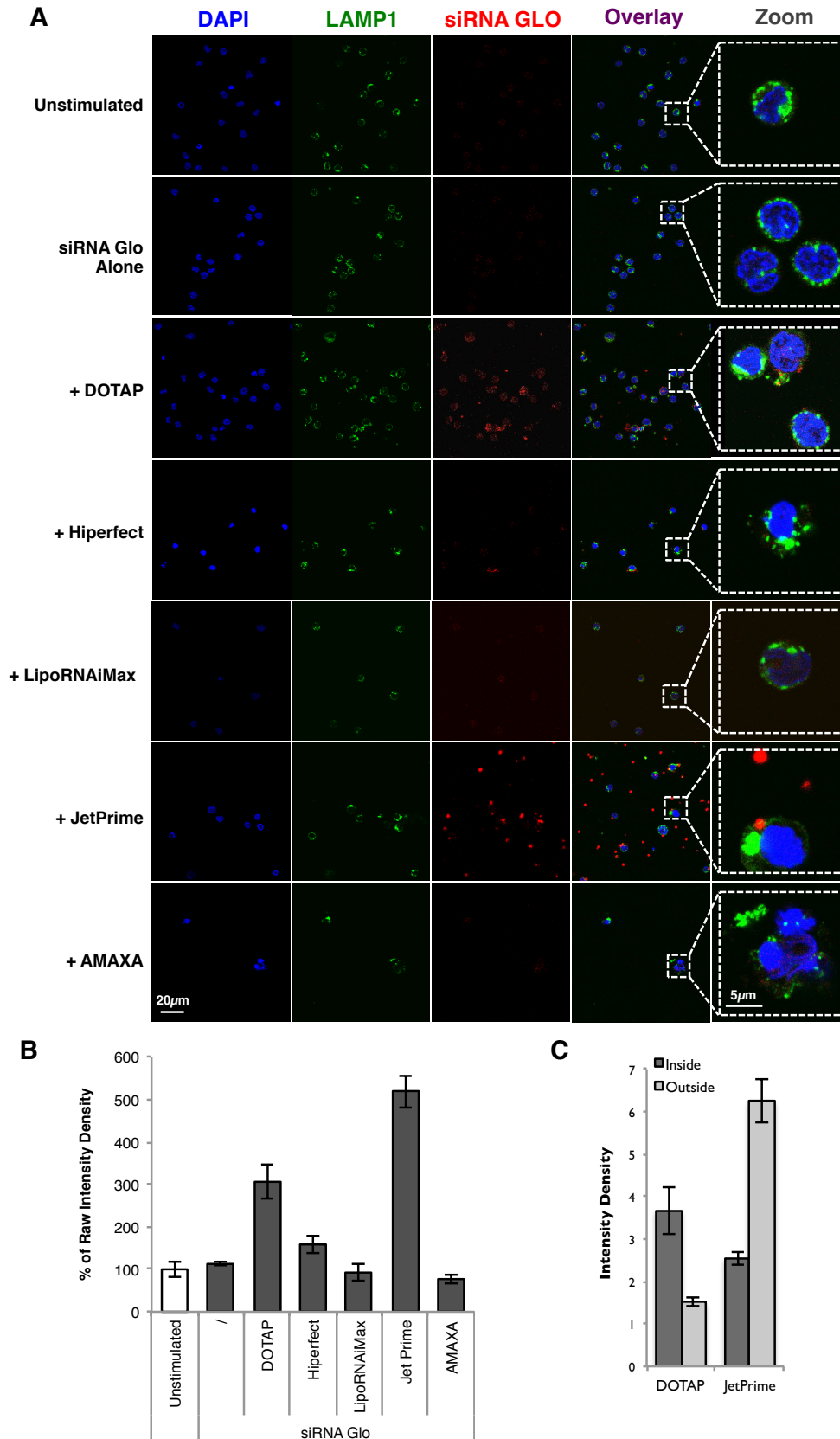


**D**



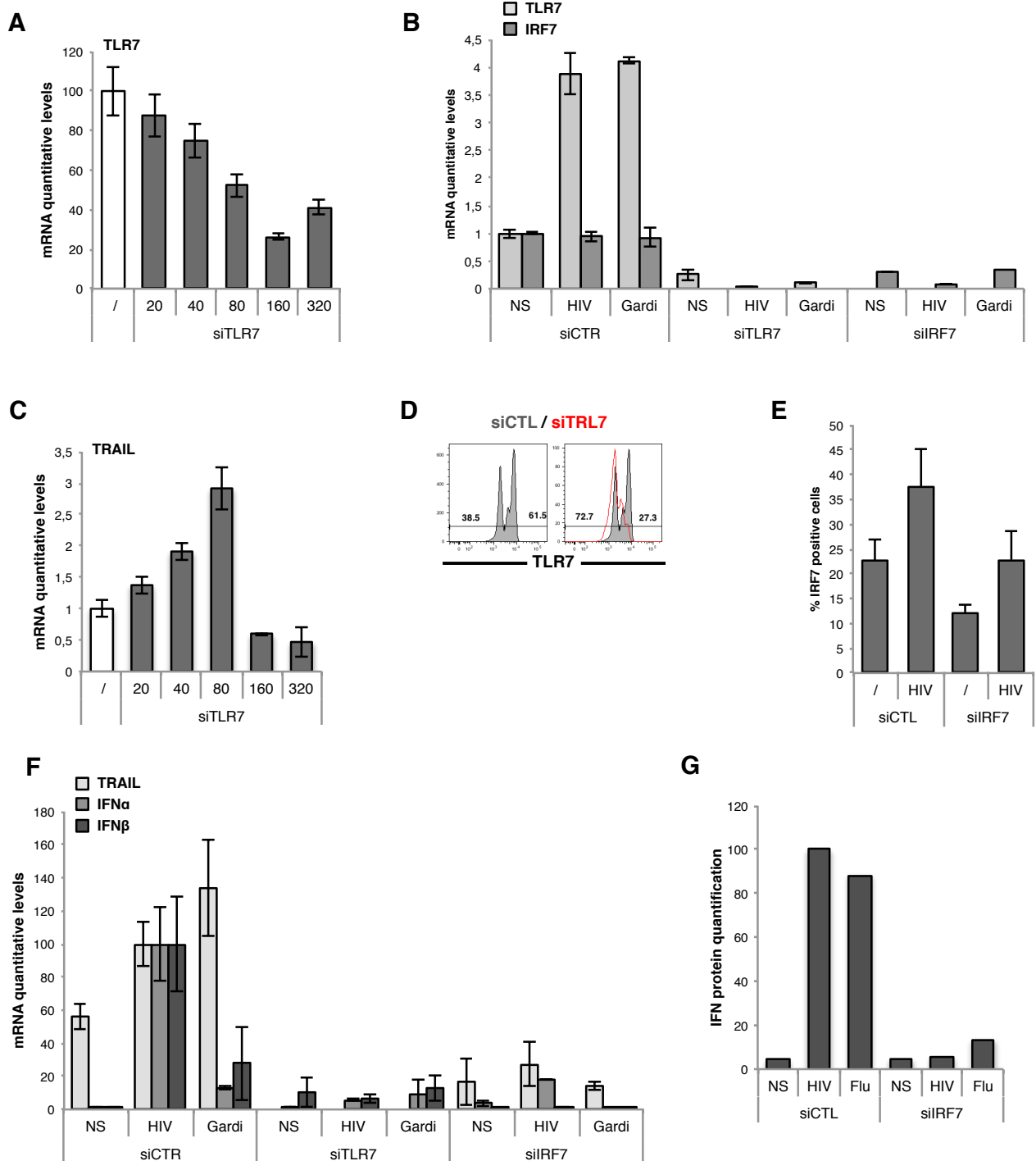
**Figure 3:** Comparison of the percentage of the transfection of the siRNA Cyclophiline B coupled with a Glo-DYE-647 using the different transfection reagents. (A) Purified pDC were cultured for 4 hours with the different reagents complexed with the siRNA Cyclophiline B coupled with a Glo-DYE-647 so that the fluorescent of the siRNA could be measured by FACS (bottom panels) after evaluating the FSC/SSC (top panels). (B) The histograms represent the percentage of positive fluorescent cells, obtained as previously described in (A). (C) mRNA levels of TRAIL from purified pDC cultured for 4 hours with the different reagents complexed with the siRNA Cyclophiline B were measured by RT-qPCR and normalized to RPL13A. (D) mRNA levels of Cyclophiline B from purified pDC cultured for 24 hours with the different reagents alone, complexed with the siRNA Control or with the siRNA Cyclophiline B were measured by RT-qPCR and normalized to RPL13A.

**Figure 4 : Microscopy**



**Figure 3:** Comparison of the fluorescent of the siRNA Cyclophiline B coupled with a Glo-DYE-647 using the different transfection reagents by microscopy. (A) Purified pDC were cultured for 4 hours with the different reagents complexed with the siRNA Cyclophiline B coupled with a Glo-DYE-647. Cells were harvest and coated on collagen slides, then fixed and permeabilized with Saponin before being stained with LAMP1 (a late endosome marker). Cells were then mounted with Fluoromount G with DAPI. Scale bar, 20 $\mu$ m or zoom at 5 $\mu$ m. (B) The histograms represent the percentage of Raw Intensity Density of the total siRNA Glo, normalized to cells alone. (C) The histograms represent the Intensity Density of the siRNA Glo measured inside and outside the cells. Analysis was performed using ImageJ Software.

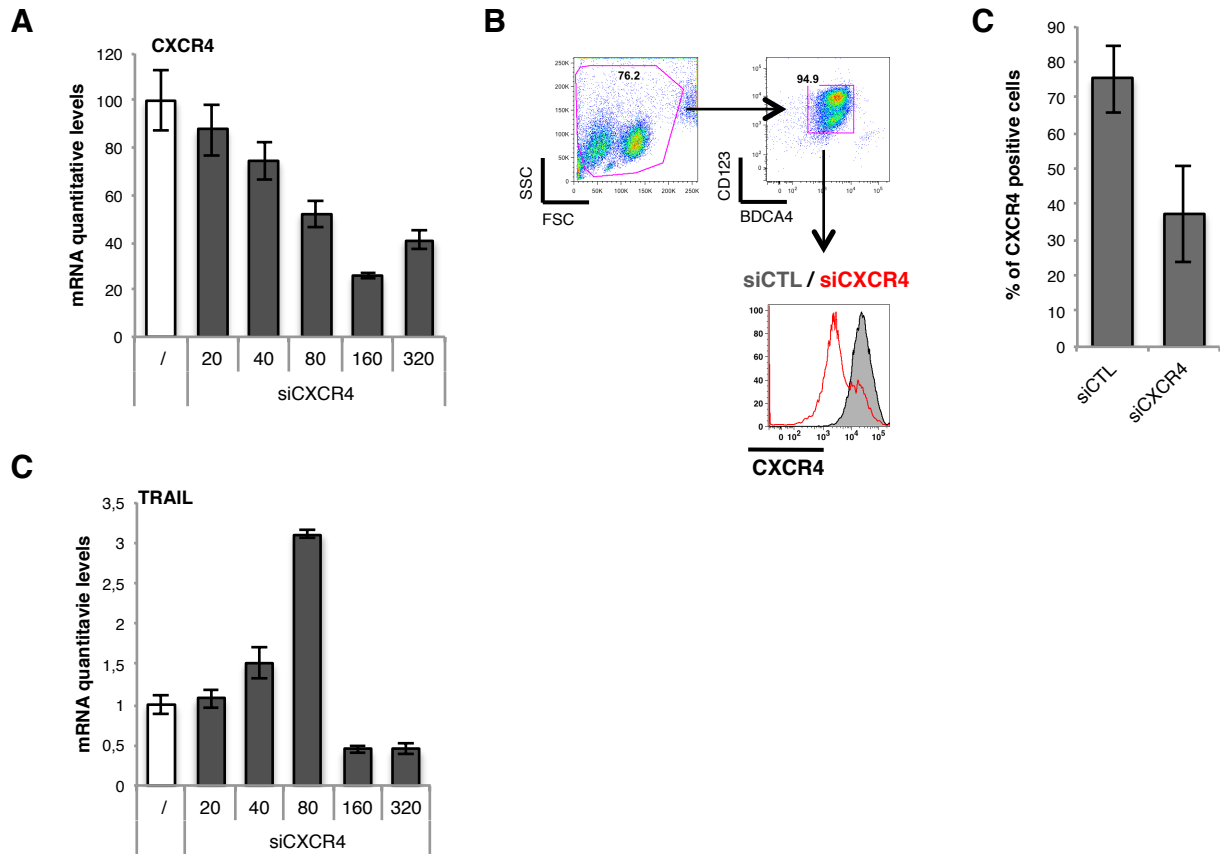
**Figure 5 : siRNA in the immune response of pDC**



**Figure 5:** Evaluation of the role of TLR7 and IRF7 in primary pDC using siRNA TLR7 and IRF7 complexed with DOTAP. (A) mRNA levels of TLR7 from purified pDC cultured for 24 hours with different concentrations of siRNA TLR7 (siTLR7) complexed with DOTAP were measured by RT-qPCR and normalized to RPL13A. (B) mRNA levels of TLR7 and IRF7 from purified pDC cultured for 24 hours with DOTAP complexed with siRNA Control (siCTR), siTLR7 or siRNA IRF7 (siIRF7) and stimulated overnight with HIV (AT-2) X4 or a TLR7 agonist Gardiquimod (Gardi) were measured by RT-qPCR and normalized to RPL13A. (C) mRNA levels of TRAIL from purified pDC cultured for 24 hours with different concentrations of siTLR7 complexed with DOTAP were measured by RT-qPCR and normalized to RPL13A. (D) Protein level of IRF7 from purified pDC cultured for 24 hours with siCTL or siIRF7 cultured or not with HIV(AT-2) X4 was evaluated by FACS. (E) Graphic represents MFI of FACS histogram from cells from (D). (F) mRNA levels of TRAIL, IFN $\alpha$  and IFN $\beta$  from purified pDC cultured for 24 hours with DOTAP complexed with siRNA Control (siCTR), siTLR7 or siRNA IRF7 (siIRF7) and stimulated overnight with HIV (AT-2) X4 or a TLR7 agonist Gardiquimod (Gardi) were measured by RT-qPCR and normalized to RPL13A. (G) Levels of IFN (diluted to 100) was measured in supernatants of purified pDC cultured for 4 hours with DOTAP complexed with siCTR or siIRF7 and stimulated overnight with HIV (AT-2) X4 or Flu, using the STING-37 cell line corresponding to HEK-293 cells stably transfected with an ISRE-luciferase reporter gene.



**Figure 6 : Case of CXCR4**



**Figure 6:** Evaluation of the role of CXCR4 in primary pDC using siRNA CXCR4. (A) mRNA levels of CXCR4 from purified pDC cultured for 24 hours with different concentrations of siRNA CXCR4 (siCXCR4) complexed with DOTAP were measured by RT-qPCR and normalized to RPL13A. (B) Protein level of CXCR4 from purified pDC cultured for 24 hours with siCXCR4 was evaluated by FACS. (C) The histograms represent the percentage of positive CXCR4 cells. (D) mRNA levels of TRAIL from purified pDC cultured for 24 hours with different concentrations of siCXCR4 complexed with DOTAP were measured by RT-qPCR and normalized to RPL13A.

**Table 1 : Data Compilation**

	NS	DOTAP	Hiperfect	LipoRNAiMAX	JetPrime	AMAXA
Live cells Transfection reagent	++	++	--	--	--	-
Live cells siRNA Control	++	-	--	++	---	+
Transfection Efficiency	-	+++	+++	+	+++	++
Targeted mRNA inhibition	-	+++	--	--	-	+
Cell activation	--	--	--	--	+	+++

**Table 1:** Recap Table. The table summarize the effect of each transfection reagent complexed or not with siRNA. NT corresponds to No Transfection reagent. Legend: The two first line “Live cells”: + represents live cells; “Transfection Efficiency”: + represents a high transfection; “Targeted mRNA inhibition”: + represents downregulation of the mRNA targeted by the siRNA; “Cell activation” : + represents TRAIL activation.



## ARTICLE N°3

### Transformation des cellules dendritiques plasmacytoïdes en cellules géantes multinucléées par le VIH-1

Nikaïa Smith, Mélanie Etheve-Quellejeu, Jean-Philippe Herbeuval

**Manuscrit publié dans AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES**

**Introduction:** Les tissus lymphoïdes de patients infectés par le VIH-1 occasionnellement comportent des cellules géantes multi-nucléaires (CGM). Les cellules géantes multinucléées sont formées par la fusion de cellules immunitaires sur les sites d'inflammation dans certaines pathologies infectieuses et notamment lors de l'infection par le VIH. Généralement, les macrophages tissulaires forment des CGM, cependant d'autres cellules comme les cellules dendritiques sont aussi capables de fusionner suite à des infections virales. Lorsqu'elles sont activées, les pDC migrent du sang vers les organes lymphoïdes secondaires dans lesquels sont observés des cellules géantes multinucléées. Nous nous sommes alors demandé si les pDC étaient capables de former des CGM *in vitro* suite à leur exposition avec le VIH.

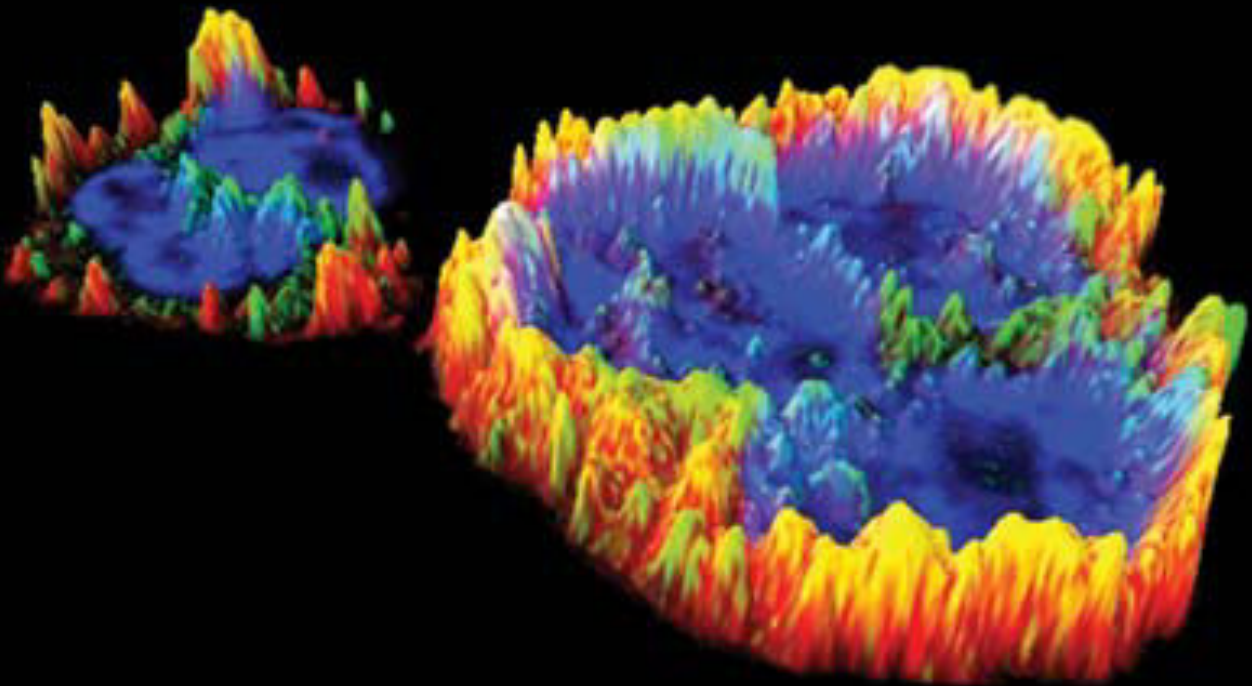
**Méthode:** Nous avons alors cultivé des pDC purifiées à partir de donneur sains en présence de VIH. Les pDC ont alors été étudiées par microscopie confocale. Des anticorps anti-p24 ont été utilisés pour détecter le VIH dans les cellules.

**Résultats:** Nous avons pu détecter des cellules géantes multinucléées en forme de roue de bicyclette uniquement lorsque les pDC étaient cultivées avec le VIH. En moyenne nous avons observés une dizaine de CGM par lame (50,000 pDC). Le ratio est faible mais très reproductif, démontrant ainsi que les pDC forment systématiquement des CGM en présence de VIH. De plus, nous avons observés des quantités de protéine p24 très importantes dans les CGM comparativement aux cellules pDC libres. Cette étude doit être poursuivie *in vivo*, cependant le fait que les pDC puissent fusionner pour former des CGM est un résultat nouveau et intéressant, d'autant plus que les CGM issues de pDC semblent concentrer le virus. Ainsi, en plus des monocytes et des macrophages, les pDC peuvent former *in vitro* des cellules géantes multinucléées avec des taux élevés de protéines virales p24 de VIH-1.



Volume 31 Number 6 • June 2015 • ISSN: 0889-2229

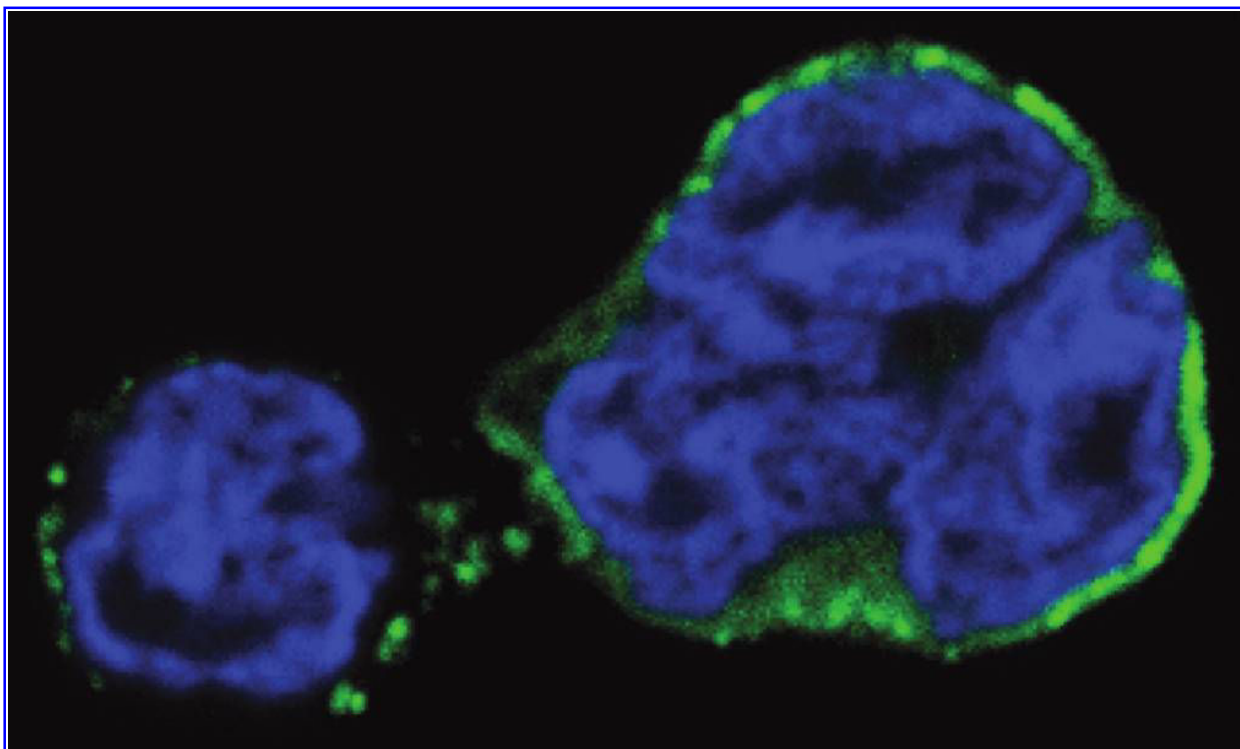
# AIDS Research and Human Retroviruses



Mary Ann Liebert, Inc.  publishers  
[www.liebertpub.com/aid](http://www.liebertpub.com/aid)

## Transformation of Plasmacytoid Dendritic Cells into Giant Multinuclear Cells by HIV-1

Nikaïa Smith, Mélanie Etheve-Quelquejeu, and Jean-Philippe Herbeuval



**FIG. 1.** Transformation of plasmacytoid dendritic cells (pDCs) into giant multinuclear cells (MGCs) by HIV-1. Human pDCs purified from healthy donors were cultured overnight in the presence of HIV. pDCs were stained with antibodies against HIV protein p24 (*green*) and with DAPI (*blue*). Cells were acquired using a confocal microscope. Analysis was performed using ImageJ software.

**L**YMPHOID TISSUES FROM HIV-INFECTED PATIENTS occasionally contain multinuclear giant cells (MGCs). These formations are found in lymphoepithelium crypts of tonsils from patients. Furthermore, they were shown to contain high levels of both HIV genome and viral products.<sup>1</sup> However, questions remained concerning their lineage, and conflicting results were generated; some reports argued for a macrophage origin and others were in favor of a dendritic cell lineage.

Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are the major source of type I interferon following HIV infection and largely

contribute to the reduction of viral spread.<sup>2</sup> pDCs express the principal receptor for HIV-1 (CD4) as well as the two coreceptors (CXCR4 and CCR5). Surprisingly, pDCs poorly replicate human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), and no more than 5% of pDCs cultured *in vitro* with HIV become productively infected.<sup>3</sup> Under HIV activation, pDCs migrate from blood to lymphoid tissues where they produce high levels of type I interferon (IFN). We thus explored whether pDCs could form MGCs *in vitro* with high titers of HIV proteins.

We show here using confocal microscopy that purified pDCs from uninfected healthy donors (HD) cultured in the

Departments of Chemistry and Biology, Nucleo(s)ptides and Immunology for Therapy (CBNIT), CNRS UMR-8601, Université Paris Descartes, Centre Interdisciplinaire des Saints-Pères, Paris, France.

presence of HIV-1 form MGCs *in vitro*. Purified pDCs were cultured overnight with HIV-1 and stained with DAPI (nucleus) and anti-p24 antibodies (green). Among the 50,000 cells in culture we found several multinuclear cells in a “bicycle wheel” shape. This very specific and recognizable formation can be detected in experiments using purified pDCs and HIV virions.

In Fig. 1, we show a giant cell with three nuclei that is grabbing a fourth one. The number of cells in these formations grows over time in a “snowball effect.” We observed up to 15 cells forming the MGC.

Our findings show that in addition to monocytes and macrophages, pDCs could form, at least *in vitro*, multinuclear giant cells containing high levels of p24 HIV proteins. Furthermore, the *in vivo* mechanism of giant cell formation by pDCs is not characterized yet, and we will further investigate whether giant cells are productively infected by HIV. *In vitro* assays showed that pDCs poorly replicate HIV; however, we can speculate that giant cells may represent the fraction of HIV-infected pDCs.

#### Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

#### References

1. Dargent JL *et al.*: HIV-associated multinucleated giant cells in lymphoid tissue of the Waldeyer's ring: A detailed study. *Modern Pathol* 2000;13:1293–1299.
2. Li G *et al.*: Plasmacytoid dendritic cells suppress HIV-1 replication but contribute to HIV-1 induced immunopathogenesis in humanized mice. *PLoS Path* 2014;10:e1004291.
3. Lederle A *et al.*: Neutralizing antibodies inhibit HIV-1 infection of plasmacytoid dendritic cells by an FcγRIIIa independent mechanism and do not diminish cytokines production. *Scientif Rep* 2014;4:5845.

Address correspondence to:

Nikaïa Smith  
 Departments of Chemistry and Biology  
 Nucleo(s)ptides and Immunology for Therapy (CBNIT)  
 CNRS UMR-8601  
 Université Paris Descartes  
 Centre Interdisciplinaire des Saints-Pères  
 45 rue des Saints Peres  
 Paris 75006  
 France

E-mail: nikaia.smith@etu.parisdescartes.fr





## ARTICLE N°4

### **Localisation de CD4 et du ligand Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis (TRAIL) dans des cellules dendritiques plasmacytoïdes stimulés par le VIH-I en microscopie à trois dimensions**

Nikaïa Smith, Mélanie Etheve-Quellejeu, Jean-Philippe Herbeuval

**Manuscrit publié dans AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES**

**Introduction:** Les pDC, en réponse à VIH-I, produisent de grandes quantités d'IFN-I. D'autre part, les pDC peuvent aussi exprimer le ligand pro-apoptotique de la superfamille du TNF, TRAIL, afin qu'elles deviennent des cellules tueuses, les IKpDC, responsables de la mort d'un grand nombre de cellules endommagées. Les pDC expriment à leur surface les différents récepteurs du VIH : CD4, CXCR4 et CCR5. Nous avons voulu déterminer si ces récepteurs étaient impliqués dans la reconnaissance du virus VIH par les pDC.

**Méthode:** Nous avons alors étudié l'activation des pDC par le VIH par microscopie. Les pDC ont été purifiées à partir de PBMC de donneurs sains. Les cellules ont été cultivées sur la nuit avec du VIH-I en présence ou absence du CD4 soluble inhibiteur de la fixation de la gp120 au récepteur CD4 ou de l'AMD3100, un inhibiteur spécifique de CXCR4. L'expression et la localisation de TRAIL et de CD4 ont été analysées en microscopie à 3 dimensions à déconvolution.

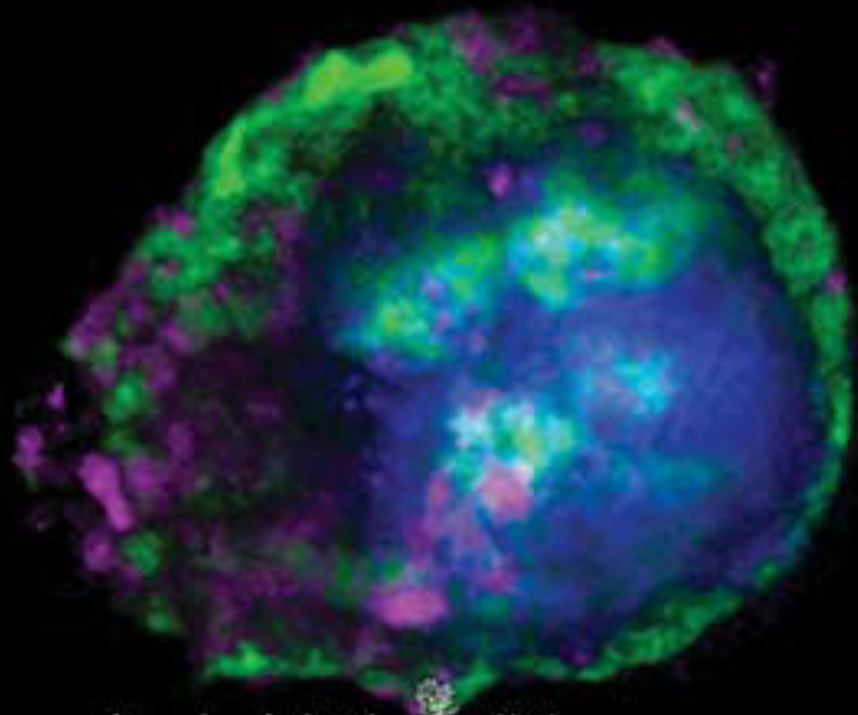
**Résultats:** Nous avons observé que seul le blocage de CD4 inhibait l'expression membranaire de TRAIL à la surface des pDC et la production d'IFN $\alpha$ . En effet, l'AMD3100 ne bloque pas l'activation des pDC (expression membranaire de TRAIL et production d'IFN) démontrant que le corécepteur CXCR4 n'est pas impliqué dans les processus d'activation. Ce résultat suggère que l'activation des pDC n'est pas dépendant de l'entrée du virus par la voie de l'infection c'est à dire après fixation de la gp120 au corécepteur. Ceci permet également de comprendre pourquoi les pDC sont très peu infectées, en effet la fixation de la gp120 au CD4 est un processus rapide alors que le changement de conformation et l'interaction avec CXCR4 sont des processus beaucoup plus lent. *In vitro*, seul 3,5% des pDC sont infectées, alors que 97% sont activées par le VIH.



Volume 30 Number 12 • December 2014 • ISSN: 0889-2229

# AIDS Research and Human Retroviruses

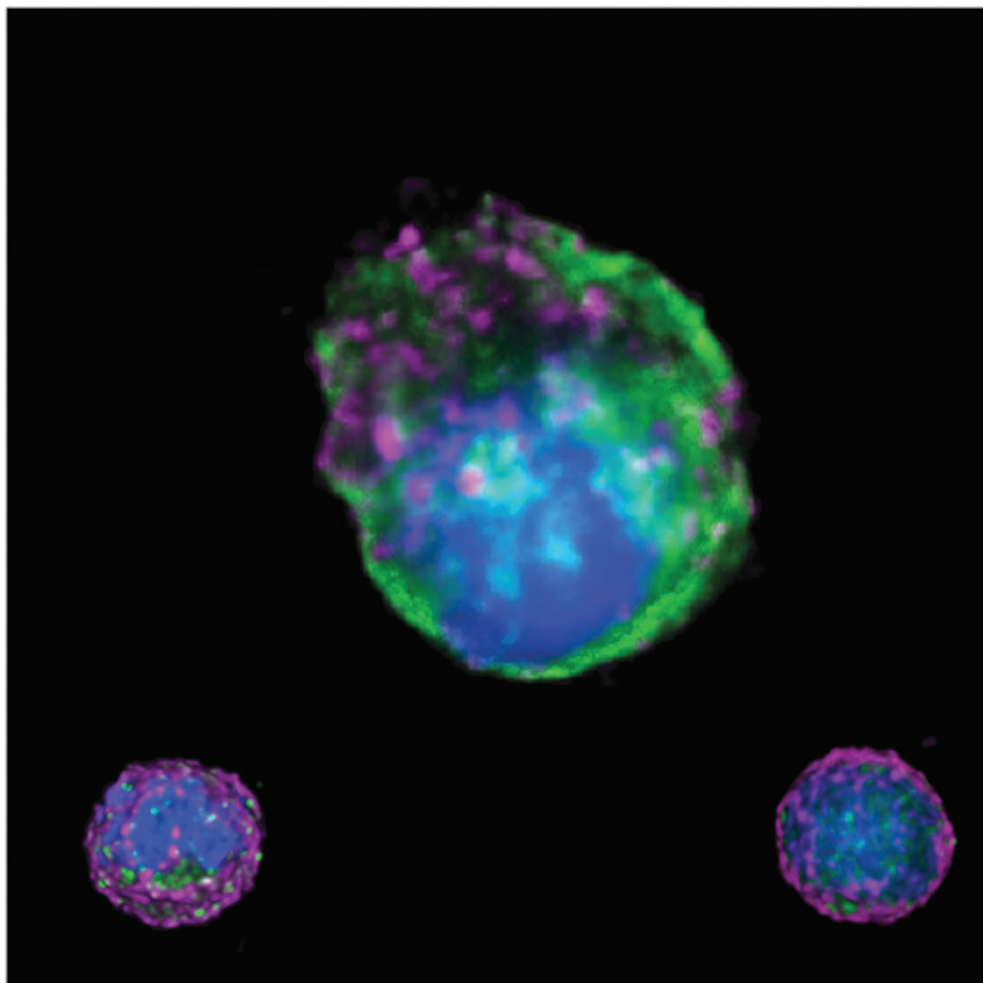
*Celebrating 30 Years of Groundbreaking Research*



Mary Ann Liebert, Inc. publishers  
[www.liebertpub.com/aid](http://www.liebertpub.com/aid)

## CD4 and Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Ligand (TRAIL) Localization in HIV-Stimulated Plasmacytoid Dendritic Cells by Three-Dimensional Microscopy

Nikaïa Smith, Mélanie Etheve-Quelquejeu, and Jean-Philippe Herbeuval



**FIG. 1.** CD4 and Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Ligand (TRAIL) localization in human plasmacytoid dendritic cells (pDCs) by three-dimensional (3D) microscopy. Human pDCs purified from healthy donors were cultured in the absence or presence of HIV and AMD-3100 or soluble CD4 for 2 h. Supernatants were removed and cells were cultured overnight. pDCs were stained with antibodies against TRAIL (*green*) and CD4 (*purple*); the nucleus was stained with DAPI (*blue*). Cells were acquired using a 3D microscope. Analysis was performed using a 3D viewer from ImageJ. Forty stacks were compiled to make a 3D view of the cells. Unstimulated pDCs (small cell, *left*) were covered by a CD4 crown (*purple*) and intracellular TRAIL (*green*). Cells cultured with HIV-1 in the presence of AMD-3100 (*center*) expressed membrane TRAIL (*green*) and CD4 (*pink*) was detected in the intracellular compartment. In contrast, pDC cultured with HIV and soluble CD4 did not express membrane TRAIL (*right*) and CD4 was expressed on the cell membrane.

Chemistry and Biology, Nucleo(s)ptides and Immunology for Therapy (CBNIT), CNRS UMR-8601, Université Paris Descartes, UFR Biomédicale des Saints-Pères, Paris, France.



SINCE THEIR DISCOVERY IN THE LATE 1990s, plasmacytoid dendritic cells (pDCs), also called interferon-producing cells (IPCs), profoundly increased our understanding of innate immunity toward pathogens. The pDC immune response against HIV-1 is characterized by a massive production of the antiviral cytokine interferon (IFN)- $\alpha$ , the acquisition of costimulatory molecules, and the membrane expression of the apoptotic ligand Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Ligand (TRAIL).<sup>1</sup> TRAIL-expressing pDCs acquire a killer phenotype, providing a new role for these cells during immune responses.<sup>1,2</sup> pDC activation by HIV is mainly due to the endocytosis pathway and not to infection.<sup>3</sup> After the initial recognition of HIV-1 by pDCs, virions are endocytosed into endosomes in which the viral capsid is degraded by pH-dependent proteases. Thus, after capsid and envelope destruction, the viral RNA is released into endosomes and activates the Toll-like receptor 7 (TLR-7) pathway leading to IFN- $\alpha$  production and membrane TRAIL expression.<sup>2</sup>

However, questions remain concerning the initial recognition of HIV-1 by pDCs. Human pDCs are characterized by the expression of CXCR4, CCR5, and CD4 in contrast to mouse pDCs that do not express CD4. Thus, we question whether CD4 and/or its coreceptors are involved in HIV recognition by human pDCs. Previous studies showed that blocking of the CD4/gp120 interaction totally abrogated pDC activation by HIV-1,<sup>4</sup> demonstrating that CD4 is a major actor in this process. However, CXCR4 or CCR5 may also play a role in the initial recognition of the virus.

We show here (Fig. 1) that human purified pDCs cultured with HIV-1<sub>MN</sub> (X4 tropic) and CXCR4 blocker (AMD-3100) become activated by expressing membrane TRAIL similar to pDCs cultured with HIV-1 alone. In contrast, pDCs cultured with HIV in the presence of soluble CD4 do not express membrane TRAIL. Using a three-dimensional (3D) viewer from ImageJ we compiled more than 40 stacks per cell, allowing a 3D view of the cells and proteins. We observe that unstimulated pDCs (left cells) express high levels of membrane CD4 (purple), and we can distinguish TRAIL (green) under this CD4 crown. Thus, pDCs were exposed to HIV-1 and AMD-3100 for 2 h, and supernatants were removed. pDCs were then cultured overnight and stained with CD4 and TRAIL (center). We observe that CD4 molecules are endocytosed into HIV-exposed pDCs and that TRAIL is expressed on the membrane despite the presence of the CXCR4 inhibitor. Thus, AMD-3100 does not block TRAIL expression and CD4 endocytosis, demonstrating that the initial

recognition of HIV by pDCs is due to CD4/virus binding and not to a coreceptor/virus interaction. In contrast, we found that pDCs cultured with the mix of HIV and soluble CD4 did not express membrane TRAIL, and CD4 was expressed on the cell membrane (right). These latter results highlight a major difference between endocytosis and infection.

Our findings may help to explain why the majority of pDCs become activated and not infected by HIV. Indeed, the binding of gp120 to CD4 is a fast process involving only two proteins. In contrast, CXCR4 binding to gp120 is a complex and slow process, thus it is statistically less frequent than CD4-gp120 binding. This is confirmed by *in vitro* experiments, in which more than 99% of pDCs become activated and less than 1% become infected by HIV.

#### Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

#### References

1. Hardy AW, Graham DR, Shearer GM, and Herbeval JP: HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN- $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(44):17453–17458.
2. Stary G, Klein I, Kohlhofer S, *et al.*: Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4+ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients. *Blood* 2009;114(18):3854–3863.
3. Beignon AS, McKenna K, Skobeme M, *et al.*: Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest* 2005;115:3265–3275.
4. Pritschet K, Donhauser N, Schuster P, *et al.*: CD4- and dynamin-dependent endocytosis of HIV-1 into plasmacytoid dendritic cells. *Virology* 2012;423(2):152–164.

Address correspondence to:

Jean-Philippe Herbeval  
 Director of Research  
 Chemistry and Biology, Nucleo(s)ptides  
 and Immunology for Therapy (CBNIT)  
 CNRS UMR-8601  
 Université Paris Descartes  
 Paris 75006  
 France

E-mail: jean-philippe.herbeval@parisdescartes.fr



# **DISCUSSION, PRÉSENTATION DES RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES ET PERSPECTIVES**





Lors de ma thèse, je me suis en partie intéressée à la modulation de l'interféron de type I et de l'activation des pDC lors de la réponse immunitaire innée contre divers pathogènes.

## **I. RÉSULTATS MAJEURS OBTENUS**

Notre étude a permis d'identifier un nouveau phénomène physiologique qui pourrait expliquer un grand nombre d'événements observés mais aussi d'identifier une nouvelle cible thérapeutique qui pourrait s'avérer prometteuse.

En effet, nous avons mis en évidence les effets inhibiteurs des amines sur des pDC primaires activées *in vitro* mais également *in vivo* dans un modèle de souris infectées par la grippe développé en collaboration avec le Dr Andreas Wack au Crick Institute à Londres. Ce mécanisme, bien que décrit pour l'histamine, a été étendu à d'autres monoamines et polyamines endogènes. Nous avons ainsi pu valider que l'action inhibitrice de toutes ces molécules s'effectue grâce la présence d'une ou plusieurs amines protonées à pH physiologique.

D'autre part, nous avons identifié le récepteur de ces amines, qui n'est pas le récepteur à l'histamine comme précédemment suggéré, mais le récepteur aux chimiokines, CXCR4. CXCR4 est un récepteur endogène exprimé par une grande majorité des cellules, notamment par l'ensemble des cellules immunitaires. Il apparaît donc que cibler CXCR4, dans le but de diminuer les réponses immunitaires excessives dans un grand nombre de pathologies dans lesquelles l'IFN-I est néfaste, pourrait représenter une nouvelle approche thérapeutique.

## **II. MODÈLE UTILISÉ**

L'étude des réponses immunitaires innées est très complexe. Afin d'être au plus proche de la physiologie des phénomènes observés, il nous a semblé essentiel d'étudier les pDC primaires purifiées à partir du sang de donneurs sains. En effet, les pDC sont des cellules rares (moins de 1% des PBMC) et fragiles, qui ont une durée de vie courte et qui ont des réponses très spécifiques.

L'étude sur des lignées cellulaires comme les Gen2.2 ou les Cal1 peuvent donner des résultats différents des pDC primaires, car par exemple, elles s'infectent à des taux plus élevés que les pDC et produisent moins d'IFN-I en réponse à des ligands synthétiques.

Nous avons aussi utilisé un modèle murin afin de réaliser les expériences *in vivo*. Ces études ont été faites en collaboration avec l'équipe d'Andreas Wack qui a récemment montré que l'IFN de type I massivement produit lors d'une infection par la grippe avait des conséquences néfastes sur les tissus environnants. Ce modèle correspond donc parfaitement à notre étude. Des souris I29S8 de douze semaines ont été infectées par un virus Influenza A de souche X31 (H3N2)

en intranasal et les dosages des différentes cytokines (IFN-I, IFN-III, TRAIL) ont été effectués sur les fluides récupérés après des lavages broncho-alvéolaires.

Nous voulions étudier l'activation virale de TLR7 par des virus à ARN dans les pDC. Nous avons alors utilisé un virus VIH-1 de tropisme CXCR4 (HIV<sub>MN</sub>) ou CCR5 (HIV<sub>ADA</sub>), un virus de la grippe (H1N1) et le virus de la dengue (DENV-2 16681). Pour activer les pDC, le virus doit être endocyté après avoir été reconnu par les récepteurs membranaires spécifiques ; l'utilisation d'un virus VIH non infectieux est alors suffisante. Le virus VIH est traité à aldrithiol-2 (AT-2), un agent faiblement oxydant qui élimine la capacité infectieuse des virions en modifiant les liaisons covalentes des groupements thiols des cystéines sur les protéines formant des doigts de zinc à l'intérieur des virus, notamment dans la nucléocapside. La structure et l'intégrité fonctionnelle des glycoprotéines de l'enveloppe sont maintenues et les virions sont capables d'interagir avec les récepteurs membranaires (Arthur *et al.*, 1998; Rossio *et al.*, 1998).

Afin de mieux comprendre le rôle inhibiteur de l'histamine sur l'activation des pDC, nous avons utilisé une molécule synthétique, le clobenpropit (CB) qui est à la fois un antagoniste H3R et un agoniste H4R. En effet, l'histamine est dégradée très rapidement par les protéases histaminases présentes dans le sérum de veau foetal utilisé dans le milieu de culture des pDC. Le CB permet donc de palier à ce problème. Nous avons aussi étendu nos recherches à d'autres amines neurotransmetteurs comme la dopamine et la sérotonine ainsi qu'à des polyamines très présentes dans l'organisme, la spermine et la spermidine, aucune de ces molécules ne se fixant à priori aux récepteurs à l'histamine. Afin d'étudier le rôle de la fonction amine sur les molécules, nous avons synthétisé l'agoniste de la sérotonine, le FFN-511, qui a la caractéristique d'être fluorescente et donc d'être localisable à l'intérieur des cellules. D'autre part, nous avons aussi synthétisé une molécule analogue du FFN-511 mais dont la fonction amine (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) a été remplacée par un groupe carboxylate (CO<sub>2</sub><sup>-</sup>), le FC-CO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

### **III. QUEL LIEN EXISTE-IL ENTRE L'ACTIVATION DE CXCR4 PAR DES AMINES ET L'ACTIVATION DES TLR ?**

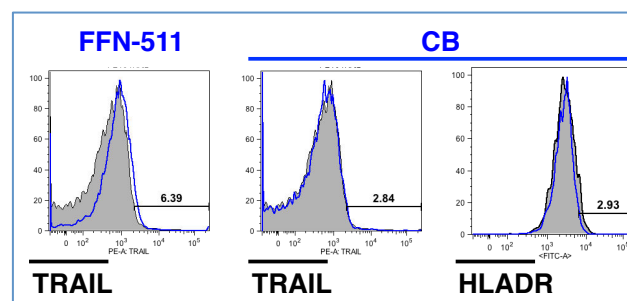
#### **III. A. LE RÔLE DES AMINES SUR LES PDC**

Comme décrit précédemment, très peu de recherches ont été effectuées sur le rôle des amines et polyamines sur les pDC en particuliers. Les études ont porté sur le rôle immuno-modulateur de l'histamine sur les cellules dendritiques, les monocytes, les cellules de

Langerhans, les cellules NK, les lymphocytes T et B... (O'Mahony *et al.*, 2011). Deux études seulement démontrent du rôle des amines sur les pDC : la première équipe a montré que les pDC étaient inhibées en présence d'histamine par H2R (Gschwandtner *et al.*, 2011; Mazzoni *et al.*, 2003) ; une autre équipe qui travaille sur le rôle de l'histamine dans le psoriasis, suggère que l'inhibition de l'activation des pDC s'effectue par l'interaction de l'histamine avec son récepteur H4R (Gschwandtner *et al.*, 2011; Mazzoni *et al.*, 2003).

Cependant, il n'y a de nombreuses pathologies dans lesquelles les pDC peuvent être à proximité de hautes concentrations d'histamine, et qui peuvent expliquer les résultats observés. Par exemple, lors d'épisodes asthmatiques allergiques il y a un large relargage d'histamine dans les poumons qui corrèle avec une inhibition des réponses immunitaires en cas d'infection. D'autre part, les polyamines sont connues pour leur rôle dans la croissance cellulaire et notamment dans les cancers, dans lesquels les pDC sont plutôt connues pour avoir un rôle de tolérance.

Nous nous sommes tout d'abord demandés quel était le rôle des amines sur des pDC non activées. Nous avons évalué la survie cellulaire des pDC après 24h en présence des différentes amines et polyamines par la méthode du bleu de trypan. La Supplemental Figure 1b et 2c de l'Article n°1 montre que les amines n'ont pas de rôle sur la viabilité cellulaire à 24h. En effet, nous n'observons ni survie ni mort cellulaire. Parallèlement, nous avons étudié l'expression des marqueurs d'activation (TRAIL, HLADR) des pDC en présence de ces amines et nous n'avons pas observé de variation de ces marqueurs.



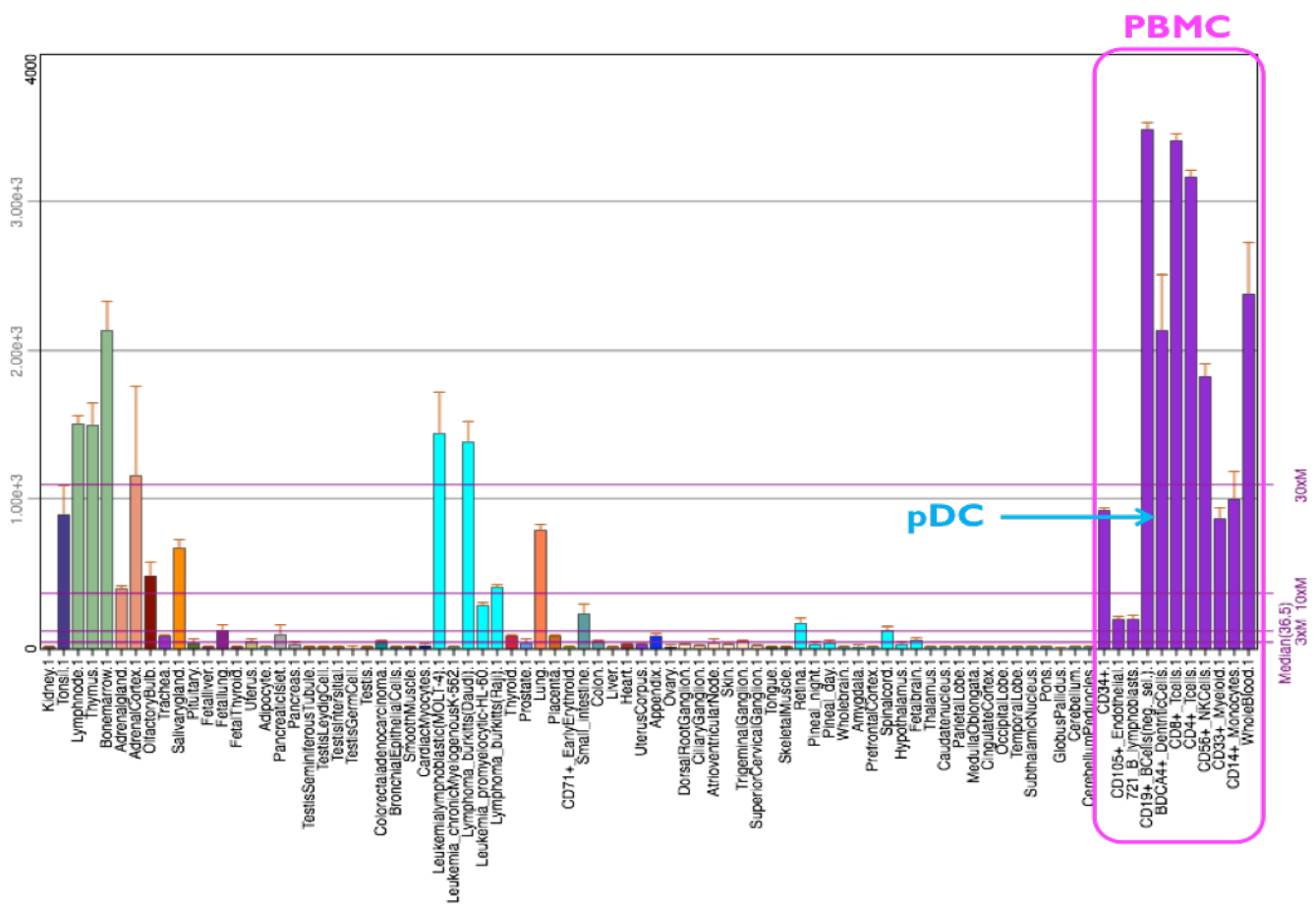
**Figure D1 : Marqueur d'activation des pDC en présence de FFN-511 ou de CB**

### III. B. RÔLE DE CXCR4 DANS L'IMMUNITÉ

#### III. B. I. Généralités sur le rôle de CXCR4 dans la physiologie

CXCR4 (CD184) est un récepteur ubiquitaire aux chimiokines (CKR = chemokine receptor) de type C-X-C qui appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) de classe I contenant 7 domaines transmembranaires (7TM). Dans des conditions

physiologiques normales, CXCR4 est principalement exprimé sur les cellules hématopoïétiques et les cellules du système immunitaire mais aussi sur une grande variété de tissus comme les tissus lymphatiques, le thymus, le cerveau, la rate, l'estomac et le petit intestin, sur lesquels il a un grand nombre de fonctions (Figure D2). En effet, CXCR4 a un rôle important dans le recrutement des leucocytes vers les sites des pathologies, le maintien des cellules souches hématopoïétiques CD34+ dans leur site d'hébergement « homing » dans la moelle osseuse et dans le développement du système immunitaire, du système nerveux central et du système cardiovasculaire mais aussi dans les métastases tumorales.

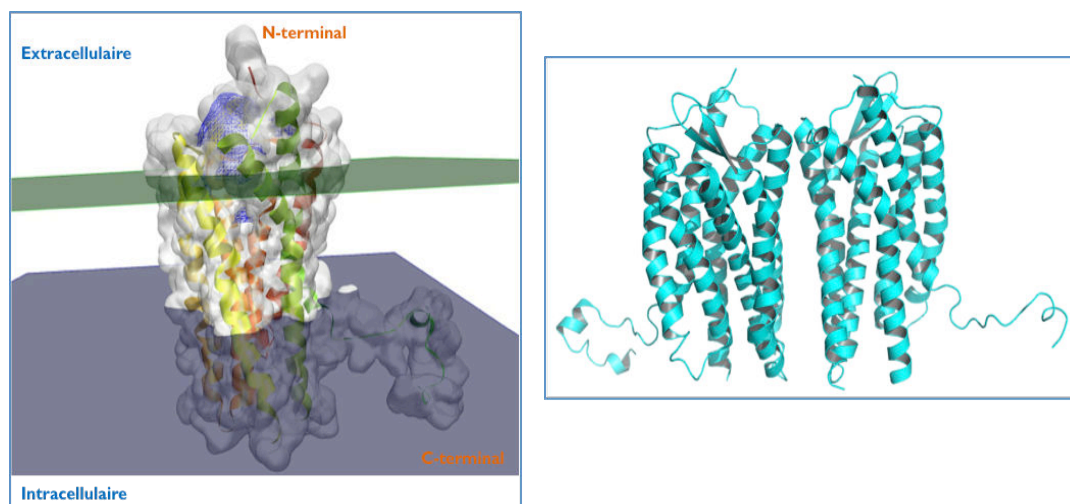


**Figure D2 : Présence tissulaire et cellulaire d'ARNm de CXCR4**  
Réalisé avec BioGPS.org

CXCR4 est le récepteur spécifique de la chimiokine CXCL12, connu aussi sous le nom de SDF-1 (stromal-derived-factor-1) (Nagasawa *et al.*, 1996b ; Nagasawa, 2015), qui peut aussi se fixer à CXCR7. CXCL12 est une chimiokine homéostatique de 8 kDa composée de 67 acides aminés et est localisée principalement dans la moelle osseuse. Lorsque CXCL12 se fixe à CXCR4, cela provoque une migration directionnelle des cellules vers une localisation spécifique : le chimiotaxisme (Nagasawa *et al.*, 1996b). L'axe CXCR4/CXCL12 est essentiel pendant l'embryogénèse, l'hématopoïèse (migration cellulaire notamment des leucocytes de la moelle

osseuse vers le sang et les tissus afin d'assurer un équilibre quelques soient les conditions), l'organisation du système immunitaire (attraction des cellules immunitaires vers les sites inflammatoires où les chimiokines activent les molécules d'adhésion et la polarisation des lymphocytes T CD4+ afin qu'ils deviennent des cellules effectrices pro-inflammatoires) et le développement des métastases (les cellules cancéreuses expriment les chimiokines et leurs récepteurs, activant ainsi une boucle autocrine mais aussi peuvent recruter des cellules du système immunitaire et favoriser l'angiogenèse). L'absence de la protéine CXCL12 ou du récepteur CXCR4 induit la mort embryologique des souris KO (Nagasawa *et al.*, 1996a; Tachibana *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 1998).

Le couple CXCL12/CXCR4 est une cible thérapeutique très intéressante en raison de ses rôles primordiaux dans des processus physiologiques comme l'entrée du VIH, les métastases tumorales, le trafficking cellulaire dans les maladies auto-immunes et dans les conditions inflammatoires. Ainsi, une intervention sur l'interaction entre CXCL12 et CXCR4 semble être prometteuse pour une variété d'applications cliniques.



**Figure D3 : Structure monomérique et dimérique de CXCR4 selon le modèle 3ODU**

*Modifié à partir de (Wu et al., 2010)*

CXCR4 est composé de 352 acides aminés avec le N-terminal du côté extracellulaire, sept domaines transmembranaires et le C-terminal du côté intracellulaire. CXCL12 se fixe sur la queue libre du côté N-terminal et sur les boucles extracellulaires. Plusieurs études cristallographiques, comme la structure 3ODU, tendent à montrer que CXCR4 forme un homodimère. On peut aussi noter que la cavité de fixation du ligand sur CXCR4 est plus grande et plus proche de la surface extracellulaire que les autres GPCR (Wu *et al.*, 2010) (Figure D3).

CXCR4 est l'un des corécepteurs du VIH, avec CCR5 (C-C chemokine receptor), permettant son entrée dans les cellules cibles du système immunitaire et joue un rôle

physiologique important dans l'infection virale (Signoret *et al.*, 1998). Dans les phases précoces de l'infection, le VIH utilise principalement le corécepteur CCR5 alors que pendant les phases chroniques de l'infection le virus utilise plutôt le corécepteur CXCR4. Ainsi, comme nous voulons étudier le rôle néfaste de l'IFN-I lors des phases chroniques de l'infection par le VIH nous utilisons principalement un virus de polymorphisme X4. D'autre part, il a été montré que le virus VIH de tropisme X4 entraînait une diminution drastique des lymphocytes T CD4+.

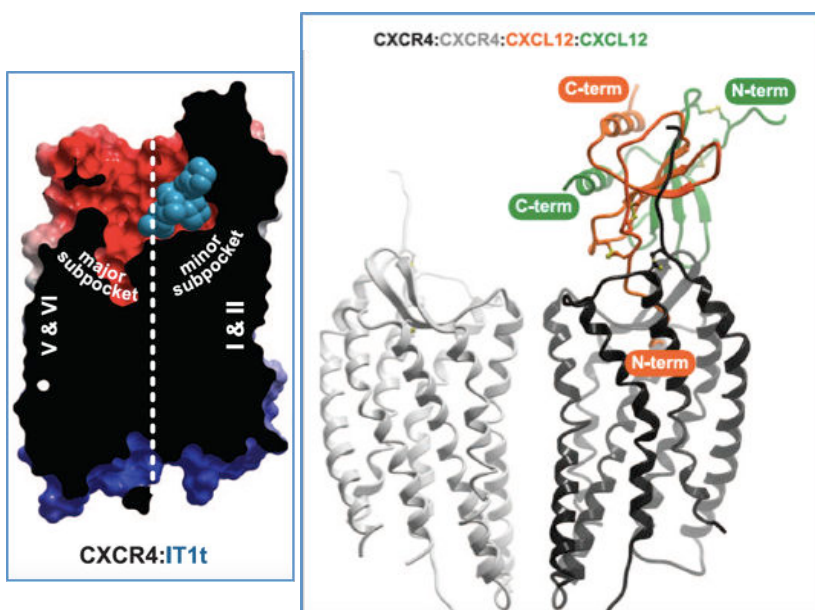
CXCR4 est aussi un marqueur de pronostic dans différents cancers comme les leucémies, les cancers du sein, des poumons, de la prostate, des ovaires et du colon dans lesquels l'axe CXCL12/CXCR4 joue un rôle important dans la progression de la maladie (Zhang *et al.*, 2015). De plus, les organes et tissus qui possèdent de hauts niveaux de CXCL12 attirent les cellules cancéreuses qui expriment CXCR4. En effet, CXCR4 a été associé avec plus de 20 types de cancers différents.

CXCL12 joue le rôle de cytokines pro-inflammatoires en se fixant à CXCR4 dans le développement de maladies auto-immunes comme l'arthrose rhumatoïde. Les lymphocytes T des ganglions lymphatiques migrent en direction de CXCL12 présent dans les articulations arthritiques, dépendamment de l'expression de CXCR4 à leur surface, validant le rôle de CXCR4 dans le chimiotaxisme des lymphocytes T. La surexpression de CXCR4 et de CXCL12 promeut aussi la pathogénicité du SLE. Ainsi, CXCR4 est considérablement augmenté sur les monocytes, les neutrophiles et les lymphocytes B alors que CXCL12 est lui augmenté dans la peau et dans les reins attirant ainsi les cellules immunitaires.

### III. B. 2. Interaction entre CXCR4 et CXCL12

La résolution de la structure du complexe CXCR4:CXCL12 a été limitée à de la résonance magnétique nucléaire (RMN) entre la chimiokine et des peptides dérivés de la partie N-terminal de CXCR4 (Ryu *et al.*, 2007). Cependant, plusieurs structures cristallographiques de CXCR4 ont été obtenues avec les antagonistes IT1t et CXV15 (Wu *et al.*, 2010). Plus récemment, une nouvelle structure cristallographique de CXCR4 complexée avec vMIP-II, une chimiokine virale de type CC codée par HHV-8 ou KSHV (Human herpesvirus-8 / Kaposie's sarcoma-associated herpesvirus) structurellement proche de CCL3 et qui se fixe à un grand nombre de CKR afin d'inhiber leur action antivirale (Qin *et al.*, 2015). vMIP-II a été sélectionnée à la place du ligand naturel car la fixation de haute affinité de CXCL12 nécessite le couplage des protéines G à son récepteur, alors qu'il est inutile à la fixation de l'antagoniste. Ainsi, les auteurs ont pu établir que la stoechiométrie de la structure est de 1:1 comme l'avait précédemment montré par modélisation puis validé pharmacologiquement l'équipe de Handel (Kufareva *et al.*,

2014). La chimiokine interagit par son corps globulaire avec le côté N-terminal du récepteur appelé site de reconnaissance aux chimiokines I (chemokine recognition site I = CRSI) ce qui oriente le N-terminal de la chimiokine flexible à interagir avec la poche TM du récepteur (CRS2). Une zone intermédiaire a été identifiée et nommée CRSI.5. La poche d'interaction de CXCR4 est ouverte et chargée négativement et peut être séparée en une sous-poche majeure et une sous-poche mineure. Ainsi, l'inhibiteur IT1t se fixe exclusivement à la sous-poche mineure, délimitée par les TM-I, -II, -III, et -VII et n'ont aucun contact avec les TM-IV, -V et -VI, en interagissant avec la l'acide glutamique E288 (GluVII:39), tout comme les résidus de l'extrémité N-terminal de CXCL12. De même que le montre les études précédentes, CXCR4 forme un dimère lorsqu'il est complexé avec vMIP-II. Ainsi, la préservation de la dimérisation dans les différentes structures de CXCR4 suggère de sa relevance physiologique et qu'il peut fixer deux ligands monomériques. Les chimiokines CXC comme CXCL12 ont la caractéristique de présenter une torsion et ainsi de diriger le N-terminal de CXCL12 vers l'hélice V/VI du récepteur. De plus cette torsion induit la dimérisation du ligand par leurs brins  $\beta$ I qui ne sont alors plus impliqués dans l'interaction avec le récepteur mais dont la structure est compatible avec la géométrie du complexe CKR:chimiokine. Ainsi, un modèle de modélisation suggère que le dimère de CXCL12 se fixe à une seule sous-unité du CXCR4. Le rôle de CXCR4 en tant que dimère reste une question ouverte. Les hypothèses actuelles sont que (1) le dimère coordonne les signaux intracellulaires de molécules comme les protéines G ou les  $\beta$ -arrestines ; (2) le dimère coordonne les signaux intracellulaires moléculaire différents afin de former un complexe multiprotéique ; ou (3) la chimiokine sous forme d'homodimère représente un état de « référence » et l'hétérodimérisation du récepteur permet de moduler la signalisation, le trafficking et même la fixation des ligands (Stephens and Handel, 2013).



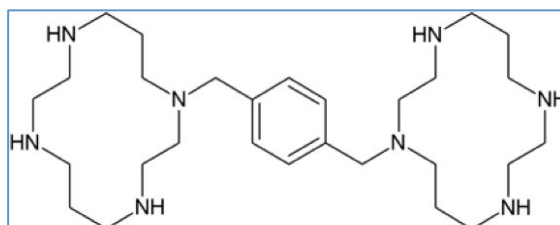
**Figure D4 : Mode de fixation de IT1t et de CXCL12 sur CXCR4.** (A) Mode de fixation de IT1t sur CXCR4. La structure de CXCR4 est présentée sur une surface coupée en sa moitié. Les couleurs représentent le potentiel électrostatique et le ligand IT1t est représenté en sphères bleues. (B) Modèle de modélisation à partir de l'hypothèse que les sous-unités du dimère de CXCL12 ne se fixent pas simultanément sur CXCR4 dimérique.

*Modifié à partir de (Qin et al., 2015)*



### III. B. 2. Identification d'antagonistes de CXCR4

L'importance de CXCR4 dans de nombreuses maladies a favorisé le développement de molécules antagonistes de CXCR4. Ainsi la première molécule antagoniste qui a été développée est l'AMD3100 (Plerixafor ou Mozobil) (De Clercq, 2015; Zhao, 2014) (Figure D5), une molécule non-peptidique composée de deux squelettes cyclam connectés avec un lien restrictif.



**Figure D5 : Structure de l'AMD3100**

Au départ, l'AMD3100 était considéré comme une molécule qui interférait avec la gp120 du VIH-I avant de découvrir qu'elle ciblait directement CXCR4. L'AMD3100 est un antagoniste spécifique de CXCR4 est bloqué ainsi l'entrée des virus VIH de tropisme X4 (Schols *et al.*, 1997), mais est aussi un agoniste allostérique de CXCR7 (= ACKR3), un récepteur leurre, en induisant uniquement le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à des concentrations de 100  $\mu$ M. De plus, l'AMD3100 est un puissant inhibiteur de CXCR4 : il bloque uniquement la voie de signalisation de CXCR4 (mesurée par flux calcique –  $IC_{50} = 600$  nM) et pas celle des autres récepteurs et ainsi bloque la fixation de CXCL12 (Hatse *et al.*, 2002).

Une étude RMN de CXCL12 en présence de CXCR4 démontre l'habileté de petites molécules comme l'AMD3100 à spécifiquement déloger l'extrémité N-terminal de CXCL12 de sa poche de fixation sur CXCR4 sans interférer avec la fixation du corps de la chimiokine (Kofuku *et al.*, 2009). Les résidus essentiels à la fixation de l'AMD3100 sur CXCR4 ont été identifiés dans la poche de fixation TM de CXCR4 par mutagenèse comme les résidus d'acides aspartiques en position 171 (AspIV :20) et 262 (AspVI :23) mais aussi d'un acide glutamique en position 288 (GluVII :06) et l'alanine en position 175 (AlaIV :24) (Gerlach *et al.*, 2001; Hatse *et al.*, 2001; Rosenkilde *et al.*, 2004). De façon intéressante, Asp171 et Asp262 sont essentiels à la fonction de CXCR4 en tant que corécepteur du VIH (Donzella *et al.*, 1998).

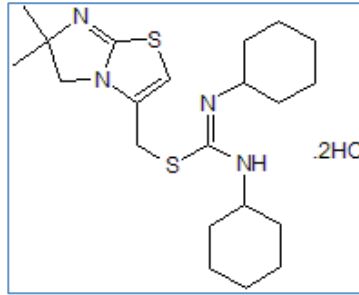
Broxmeyer *et al.*, sont les premiers à avoir montré que l'AMD3100 pouvait mobiliser les cellules souches hématopoïétiques et les cellules progénitrices (Broxmeyer *et al.*, 2005). Cette mobilisation est clairement établie par l'interaction entre CXCR4 et l'AMD3100. En effet, CXCR4 est normalement le récepteur de CXCL12 et est responsable du maintien des HSC dans la moelle osseuse. En présence de l'AMD3100, CXCL12 n'a plus accès à CXCR4 et les HSC peuvent migrer en direction d'autres chimiokines, comme la cytokine et hormone G-CSF et entrer dans la

circulation périphérique. L'AMD3100 permet de récupérer un grand nombre de HSC, technique utilisée dans les transplantations et autogreffes.

Beaucoup d'autres dérivés de cet antagoniste ont alors été synthétisés et certains font l'objet d'essais cliniques en cours (Hendrix *et al.*, 2000). La plupart des recherches se sont focalisées par la suite sur des peptides dérivés. Même si ce type de molécules présente un grand nombre de désavantages en thérapie, il a permis d'identifier un pharmacophore et ainsi de synthétiser des molécules plus petites et plus actives, qui possèdent plusieurs charges positives afin d'interagir avec les résidus acides des boucles extracellulaires de CXCR4. Toutes ces molécules appartiennent à des classes chimiques différentes. D'autre part, les molécules identifiées ont été caractérisées dans l'inhibition du chimiotaxisme mais aussi dans l'inhibition de l'entrée du VIH, mais aucune d'entre elles n'a été identifiées comme molécule inhibitrice de la production d'IFN par les pDC primaires. Une revue très complète par l'équipe de Neamati liste environ 230 composés des différentes familles chimiques de molécules qui interagissent avec CXCR4 (Debnath *et al.*, 2013).

L'AMD3100 a été utilisé afin de bloquer l'entrée du VIH dans les cellules cibles à des concentrations aussi faibles que le nanomolaire et est arrivé en phase clinique I ; cependant, il provoquait aussi le chimiotaxisme des cellules souches hématopoïétiques en bloquant le « homing », était faiblement efficace *in vivo*, présentait une cardio-toxicité et ne permettait pas une prise orale directe. D'autre part, cette molécule cible uniquement CXCR4 et ne peut donc pas bloquer l'entrée par un virus VIH de tropisme R5. L'utilisation de ce composé dans des thérapies anti-VIH n'a donc pas été poursuivie.

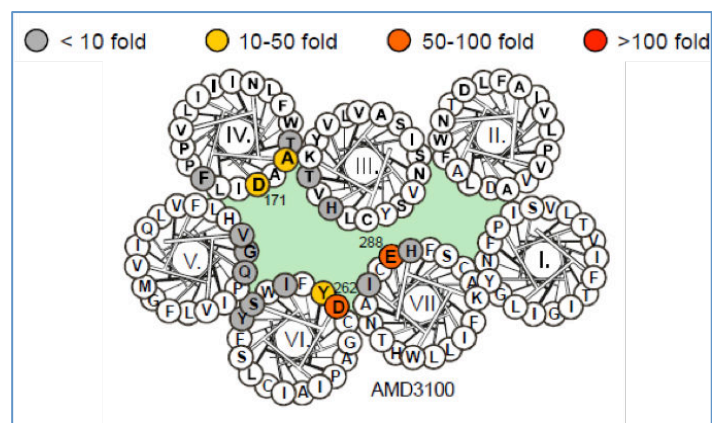
Un autre inhibiteur de CXCR4, la petite molécule isothiourée ITIt ( $IC_{50} = 1,1nM$  par rapport à l'inhibition du flux calcique induit par CXCL12) (Thoma *et al.*, 2008). L'ITIt a par ailleurs permis une des cristallisations de CXCR4 (Wu *et al.*, 2010). En effet, l'ITIt est constitué de deux cycles cyclohexanes qui rentrent dans la sous-poche mineure d'interaction et forment des liaisons hydrophobes avec CXCR4. Le cycle imidazothiazole est relié au reste de la molécule par un court bras flexible et établi une liaison électrostatique avec la Glu288. L'ITIt possède aussi des molécules d'azote (N) qui peuvent être chargées positivement à pH physiologique. Ainsi, elles peuvent former des liaisons électrostatiques avec l'Asp97 de la TM-II. La structure de l'ITIt possède des similarités fortes avec le CB. Ainsi, pour les raisons suivantes (1) ITIt est un antagoniste différent de l'AMD3100 dans son mode de fixation et se fixe dans une poche très précise et très bien caractérisée et (2) la structure de ITIt ressemble au CB et est protoné comme les autres amines testées, l'ITIt devrait ainsi être testé dans notre système. Ainsi les résultats nous permettront d'apporter des réponses quant à la fixation de nos molécules.



**Figure D6 : Structure de l'IT1t**

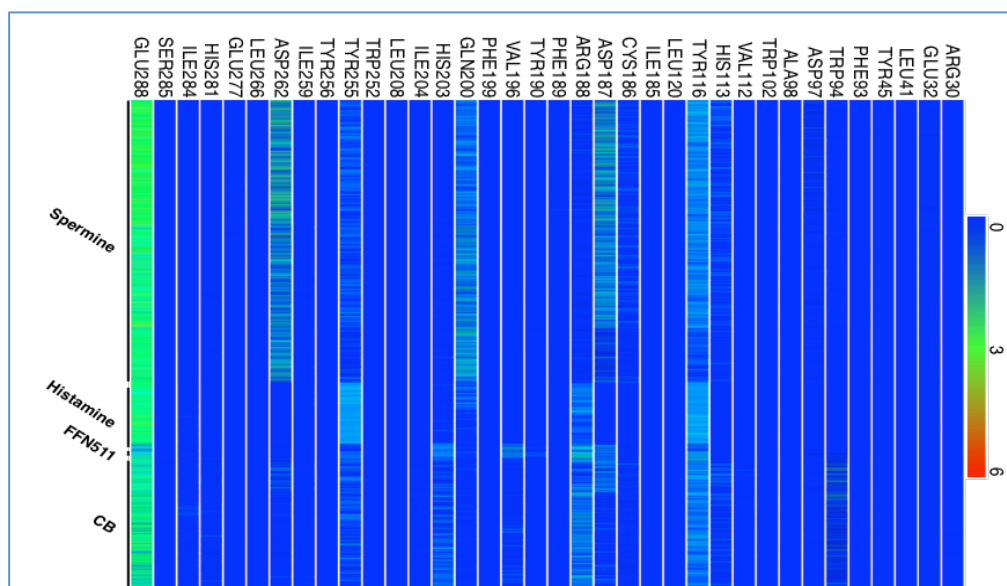
Dans notre étude, nous avons identifié des mono- et polyamines endogènes qui inhibent l'activation des pDC primaires stimulées avec différents virus agonistes de TLR7. Il a été montré que la spermine et la spermidine ainsi que divers dérivés de ces molécules pouvaient inhiber l'entrée du virus VIH de tropisme X4 (Wilkinson *et al.*, 2011; Wilkinson *et al.*, 2013). Nous sommes donc partis de ce constat pour tester si dans notre système de pDC primaires, les amines utilisées se fixaient à CXCR4 afin de bloquer l'activation des cellules. Toutes les amines testées sur les pDC, à des concentrations de l'ordre de la dizaine de  $\mu\text{M}$ , sont capables d'inhiber la production de l'IFN-I mais aussi l'expression de TRAIL ainsi que tous les gènes d'activation des pDC après une exposition virales : les gènes des IFN (*IFNA*, *IFNB*, *IFNG*, *IFNL1* et *IFNL2/3*), les gènes des cytokines pro-inflammatoires (*TNFA*, *IL6*, *IL9*, *IL10* et *IL15*), les gènes des chimiokines (*IL8* et), *iNOS* et le gène d'un ISG précoce (*ISG56*) (Figures 1, 2 et 4 de l'article n°1). Toute la voie de signalisation en aval de l'activation de TLR7 étant bloquée, il semble plausible que les amines interagissent avec un récepteur membranaire. Ainsi les amines peuvent inhiber l'entrée d'un virus qui utilise CXCR4 mais aussi la voie d'activation des cellules de l'immunité innée.

Nous avons ainsi voulu valider que les amines inhibaient les pDC par leur interaction avec CXCR4. La poche d'interaction de l'AMD3100 sur CXCR4 a été identifiée, ce qui a permis d'identifier les résidus essentiels à l'interaction entre les différents composés antagonistes et leur cible CXCR4 (Rosenkilde *et al.*, 2004) (Figure D7).



**Figure D7 : Résidus de CXCR4 interagissant avec l'antagoniste AMD3100**  
Modifié à partir de (Rosenkilde *et al.*, 2004)

Nous avons alors docké *in silico* nos molécules (histamine, CB, FFN-511 et spermine) dans la poche des antagonistes afin d'identifier les résidus essentiels à l'interaction avec CXCR4. A partir de notre modèle, nous avons pu déterminer que nos molécules se fixaient sur CXCR4 dans la poche d'interaction de l'AMD3100. Nous avons ainsi pu déterminer des scores d'interaction entre le composé et la poche d'interaction de CXCR4 (Figure 6c de l'article n°1). De façon intéressante, les scores déterminés *in silico* corrèlent avec les résultats obtenus expérimentalement. Nous avons ainsi pu déterminer le type de liaisons qui s'effectuaient entre les résidus de CXCR4 et les composés testés mais aussi les résidus essentiels à l'interaction. Après avoir généré tous les conformères de chaque composé (différents états de protonation et rotamères), nous avons effectué une *heat map* de tous les résidus qui pouvaient potentiellement interagir avec l'un des conformères de nos molécules (Figure D8).

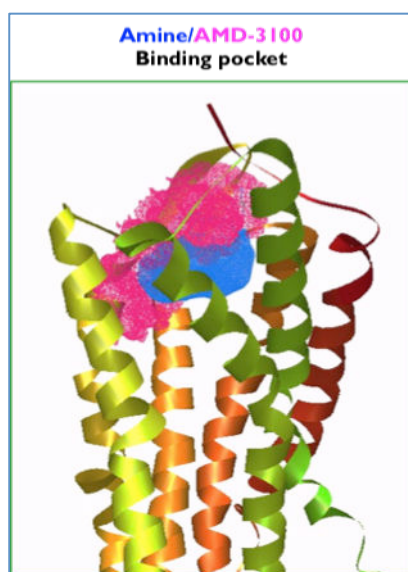


**Figure D8 : Heat Map.** Les conformères des amines ont été générés dans la poche d'interaction des antagonistes de CXCR4 et l'intensité de l'interaction avec les différents résidus de CXCR4 a été évaluée. Du bleu au rouge en passant par le vert indique la force d'interaction.

Il s'avère que certains résidus sont redondants comme notamment la Glu-288 (acide glutamique = E) qui semble essentielle à l'interaction, et qui est aussi indispensable à la fixation de l'AMD3100. On peut aussi noter que la Tyr-116 (tyrosine = Y), Asp-187 (Acide aspartique = D), Gln200 (Glutamine = Q) et la Tyr-255 semblent importants dans l'interaction avec CXCR4. De façon intéressante, ces résidus correspondent aussi à des résidus essentiels pour l'activation de CXCR4. Ainsi pour valider ces résultats, nous sommes actuellement en train de tester les différents mutants de CXCR4. Rares sont les cellules qui n'expriment pas CXCR4, cependant les HEK-293T ne l'expriment quand faible quantité (Watts *et al.*, 2013). Nous pouvons ainsi les transfecter avec les différentes formes de CXCR4 (wild type et mutants) et identifier quel est le

ou les résidus indispensables à la fixation de nos amines en regardant si l'entrée du virus est bloquée ou pas.

D'autre part, la poche d'interaction de l'AMD3100 chevauche la poche d'interaction des amines (Figure D9). Ainsi pour valider que l'effet des amines s'effectue grâce à leur interaction directe sur CXCR4, nous avons prétraité nos cellules avec de l'AMD3100 avant de les incuber avec de l'histamine, du CB ou de la spermine et de les stimuler avec du VIH X4. Nous avons pu restaurer l'effet du virus sur l'activation des pDC en bloquant l'effet inhibiteur des amines (Figure 6e de l'article n°1). Ces expériences ont donc permis de valider les résultats de modélisation *in silico* obtenus précédemment.



**Figure D9 : Poche d'interaction de l'AMD3100 et des amines se chevauchent dans CXCR4**

### III. B. 3. CXCR4 n'est pas nécessaire à l'activation des pDC par le VIH

Plusieurs études ont montré que les pDC n'étaient que faiblement infectées par le VIH (environ 3,5%), mais qu'elles étaient capables d'endocyter le virus très rapidement afin qu'il se retrouve dans des endosomes possédant les TLR (Beignon *et al.*, 2005; Pritschet *et al.*, 2012). De plus, nous avons montré que le corécepteur CXCR4 du VIH n'était pas indispensable à l'activation des pDC ; contrairement au récepteur CD4 qui semble nécessaire à cette activation (Article n°3). Par microscopie, nous voyons très clairement que la pré-incubation par de l'AMD3100 n'affecte pas l'expression de TRAIL, un ISG précoce et donc un marqueur membranaire de l'activation des pDC, à la surface des pDC, et que le récepteur CD4 est internalisé après stimulation avec un virus VIH de tropisme CXCR4, indiquant qu'il y a bien eu internalisation.

Pour valider ces résultats nous avons observé que les gènes d'activation des pDC – *TRAIL*, *IFNA*, *IFNB*, *IFNG*, *IL-6* et *ISG56* – ainsi que la production d'IFN-I des pDC stimulées par un virus VIH de tropisme X4 n'étaient pas affectés par la pré-incubation avec AMD3100 (Figure 6e de l'article n°1). Nous avons effectué des siRNA de la protéine CXCR4 sur les pDC primaires afin

d'inhiber l'expression protéique de ce récepteur et nous avons constaté les mêmes résultats. Nous pouvons donc confirmer que le corécepteur CXCR4 n'est pas indispensable à l'activation des pDC (Figure 5e, de l'article n°1).

Ce mécanisme peut s'expliquer par le fait que les pDC, en tant que première barrière de notre organisme contre les pathogènes et spécialistes de la production de l'IFN-I, doivent être capables de s'activer très rapidement afin d'inhiber la propagation virale. Ainsi, la reconnaissance du virus uniquement par son récepteur principal permet à la fois d'engendrer une réponse immunitaire plus rapide que si le virus devait se fixer à un second récepteur et d'autre part, d'éviter à la cellule d'être infectée. Il a aussi été suggéré que les lectines de type II, BDCA-2 et BDCA-4, jouaient un rôle évident dans l'internalisation des ligands, notamment des virus (Dzionek *et al.*, 2001).

Dans notre étude, afin d'éliminer toute probabilité que le virus VIH de tropisme X4 utilisé puisse avoir un effet sur nos résultats, nous avons réitéré les expériences de siRNA CXCR4 en utilisant un virus VIH de tropisme R5 mais aussi avec le virus de la grippe (Figure 5f et g de l'article n°1) ; nous avons ainsi validé de nouveau les résultats obtenus précédemment avec ces virus, confirmant que l'inhibition de l'activation des pDC par des composés aminés s'effectue bien par leur fixation sur CXCR4 quelque soit le virus.

### **III. C. L'IMPORTANCE DE NOTRE DÉCOUVERTE EN PHYSIOLOGIE ET EN PHYSIOPATHOLOGIE**

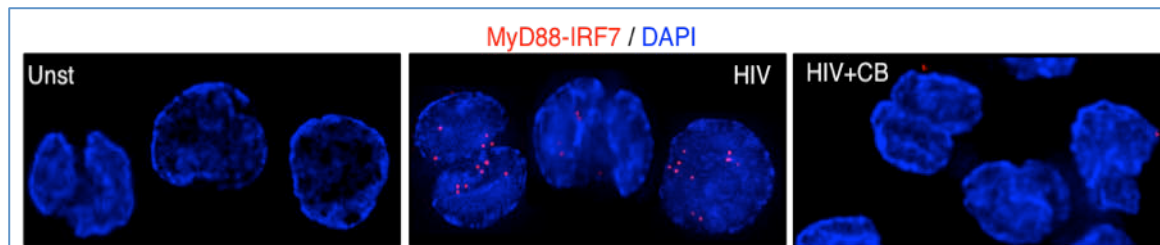
Notre étude a identifié une nouvelle voie de la régulation des pDC par des molécules endogènes, notamment par des monoamines et des polyamines naturelles et synthétiques.

Il est maintenant connu que les patients atopiques sont beaucoup plus susceptibles aux infections virales pulmonaires (détaillée dans la partie « Introduction - IV. D. LES ALLERGIES »). Cependant, leurs PBMC sont parfaitement fonctionnelles dans le sang périphérique. Notre étude permet ainsi d'éclairer les résultats observés, qui étaient expliqués jusqu'alors par l'inhibition des cellules immunitaires par le cross-link des IgER présents à leur surface. En effet, lors d'un épisode allergique, les mastocytes décharge de grandes quantités d'histamine localement qui peuvent alors inhiber les pDC qui ont migré vers ces mêmes tissus pour répondre à une infection virale ou bactérienne. Les amines bloquent alors la production d'IFN-I par les pDC mais aussi leur activation. En effet, nos travaux montrent que la production protéique de l'IFN-I est bloquée, mais aussi que les gènes d'activation des pDC comme *TRAIL*, différents interférons *IFNA*, *IFNB* et *IFNG*, mais aussi

des cytokines pro-inflammatoires *IL-6* et des ISG, *ISG56*, étaient inhibés par la présence d'amines dans le milieu de culture des pDC stimulées avec un virus.

Les pDC ont la capacité de devenir des cellules tueuses (IKpDC) qui expriment TRAIL à leur membrane très précocement après une stimulation virale. Ce phénomène intervient donc très en amont dans l'activation des pDC. Il a par ailleurs été montré que la relocalisation de TRAIL à la membrane des pDC était en partie indépendante de la production d'IFN. Il serait par ailleurs intéressant de déterminer le mécanisme précis qui permet cette relocalisation et quelles protéines présentes dans la voie de signalisation en aval de l'activation de TLR7 induit cette expression. Nous avons pu montrer par microscopie à 3 dimensions à déconvolution que la relocalisation de TRAIL à la surface des pDC était inhibée par la présence des amines (Figure 4 de l'article n°1). D'autre part, afin d'avoir une vision complète de tous les acteurs de la voie de signalisation des TLR qui étaient impactés par l'action inhibitrice des amines, nous avons étudié la relocalisation d'IRF7 dans le noyau après stimulation virale. En effet, IRF7 est exprimé constitutivement dans les pDC ce qui leur permet de produire rapidement des grandes quantités d'IFN $\alpha$  par la boucle autocrine dans le but d'augmenter l'expression des ISG. Lorsque le pathogène est endocyté, son matériel génétique est libéré dans l'endosome et va être reconnu par TLR7, qui va alors recruter MyD88 afin d'engendrer la cascade de signalisation menant à la production d'IFN-I. IRF7 est un facteur de transcription qui peut être recruté par le complexe IRAK1, TRAF6, TRAF3, IKK $\alpha$  et l'ostéopontine (OPN). Cependant, il a aussi été montré qu'IRF7 pouvait interagir directement avec MyD88 (Kawai *et al.*, 2004). La translocation d'IRF7 dans le noyau après stimulation virale est indispensable afin d'engendrer les gènes *IFNA* (Guiducci *et al.*, 2008). Nous avons utilisé la technique du PLA / Duolink qui permet de déterminer l'interaction protéine-protéine lorsque les anticorps primaires de chaque protéine sont espacés de moins de 40nm. Cette technique peut être utilisée sur des cellules primaires fragiles qui n'ont pas besoin d'être modifiées génétiquement. Les anticorps secondaires possèdent des brins d'ADN qui peuvent alors interagir et s'amplifier. Nous avons ainsi observé qu'en présence de VIH, MyD88 et IRF7 était proches dans le noyau alors que lorsque les cellules sont prétraitées avec des amines cette interaction n'a plus lieu (Figure D10).

L'ensemble de nos résultats permet ainsi de valider que les amines bloquent totalement l'activation des pDC, de l'expression des gènes d'activation, à la relocalisation protéique membranaire et nucléaire jusqu'à l'expression protéique des molécules d'activation des pDC. Les amines sont ainsi de puissants inhibiteurs de l'activation virale des pDC.



**Figure D10 : Duolink entre MyD88 et IRF7.** Des pDC stimulées avec du VIH présentent des points rouges à l'intérieur de leur noyau, signe de la translocation de IRF7. Alors que les pDC prétraitées avec du CB ne possèdent plus ces points rouges. Il y a en effet eu inhibition de la translocation d'IRF7.

Toutes ces molécules ont comme caractéristique commune de posséder des groupements amines protonées à pH physiologique. En effet, les différentes monoamines possèdent un ou plusieurs cycles avec une queue carbonée se terminant par un groupe amine alors que les polyamines sont des molécules linéaires possédant aussi des groupements amines à leurs extrémités. Nous avons alors synthétisé un agoniste de la sérotonine, le FFN-511 mais dont la fonction amine ( $\text{NH}_3^+$ ) a été remplacée par un groupe carboxylate ( $\text{CO}_2^-$ ), le FC- $\text{CO}_2^-$ . L'utilisation de cette molécule a permis de valider que la présence de l'amine sur toutes nos molécules était absolument indispensable à leur activité sur les pDC (Figure 4 de l'article n°1).

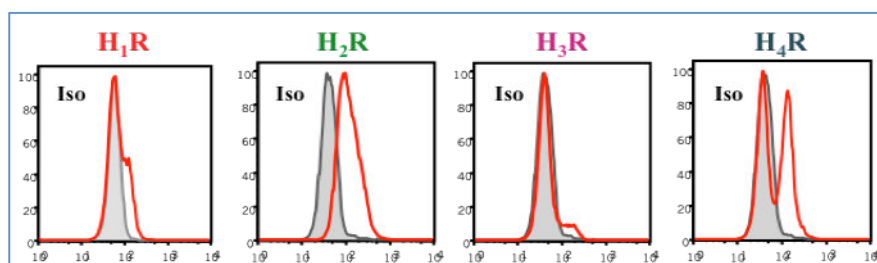
On peut cependant se poser la question de la pertinence physiologique des résultats que nous avons observés. En effet, la régulation du système immunitaire par les amines est très complexe et encore peu assez élucidée. En fonction des concentrations, de l'expression des récepteurs, du microenvironnement, l'histamine peut activer ou inhiber l'action des cellules cibles. Dans le cerveau, l'inflammation est un phénomène à éviter afin de ne pas causer de dommages tissulaires irréversibles. Or, il a été montré que de l'IFN peut être produit par les neurones (Delhaye *et al.*, 2006) mais aussi en très grande quantité par les pDC présents dans le cerveau (Lande *et al.*, 2008) ; une régulation extrêmement fine de cette cytokine doit alors être mise en place. L'histamine, mais aussi les autres neurotransmetteurs monoaminiques, peuvent alors remplir ce rôle. Cependant, il semble aberrant que le relargage massif d'histamine dans les poumons de patients asthmatiques, qui sont alors endommagés et sensibles, bloque l'activation potentielle des pDC contre les pathogènes. Ces résultats peuvent possiblement s'expliquer par le fait que les allergies et l'asthme sont des pathologies récentes et que notre organisme n'est pas habitué à de relargage aussi massif et fréquent d'histamine.

Nos résultats suggèrent un nouveau rôle potentiel des polyamines dans le cancer. En effet, les PA sont connues pour leur participation à la progression des cancers en raison de leur rôle important dans la croissance cellulaire. Or, nous savons que les pDC infiltrer les tumeurs afin de les éliminer *via* l'induction d'apoptose par la voie TRAIL. Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que les polyamines participent à une immunomodulation locale en bloquant l'action des pDC et l'expression de TRAIL et donc de favoriser la progression des cancers.



### III. D. RÔLE THÉRAPEUTIQUE POTENTIEL

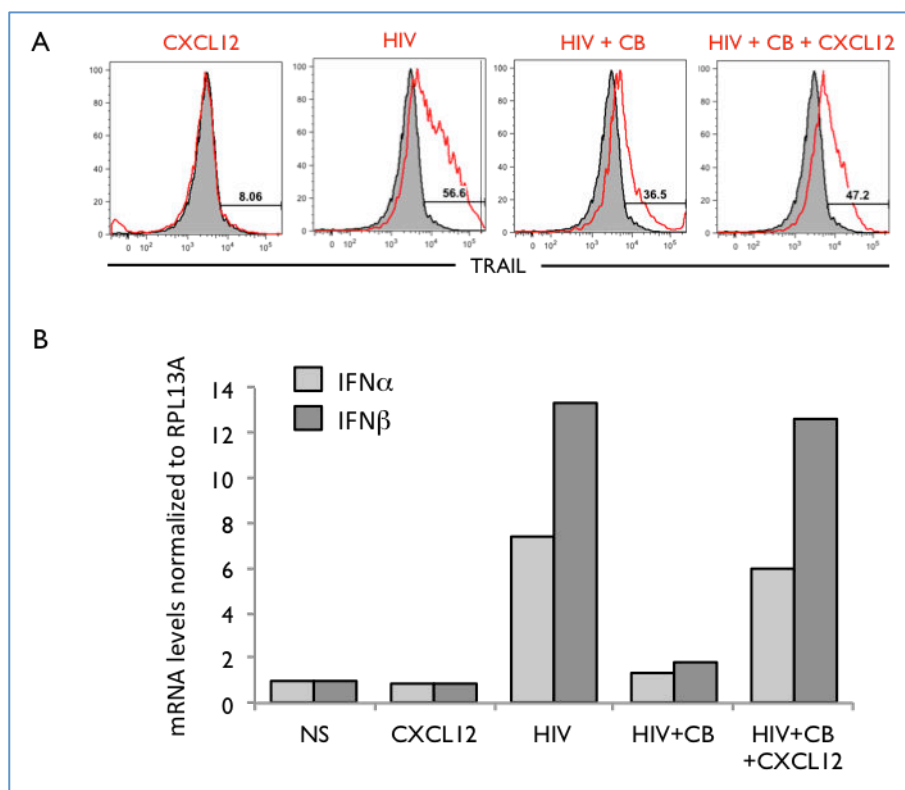
Il avait été suggéré que le rôle de l'histamine sur l'inhibition des pDC s'effectuait par leur fixation au récepteur à l'histamine (Mazzoni *et al.*, 2003). Nous avons tout d'abord montré que seuls les récepteurs H<sub>2</sub>R et H<sub>4</sub>R étaient présents sur les pDC (Figure D11). Nous avons par la suite utilisé des antagonistes connus de chaque HR afin de bloquer l'effet du CB. Or, nous avons obtenu les mêmes résultats que lorsqu'il n'y a pas d'antagonistes. Nous avons aussi purifié des pDC de souris WT ou de souris KO pour H<sub>4</sub>R et nous avons obtenu les mêmes résultats. Nous avons alors étendu notre étude à d'autres molécules monoamines et polyamines qui avaient toujours le même effet. Or ces molécules ne se fixent pas aux HR. Ces trois approches différentes valident que l'effet inhibiteur des amines observé ne passe pas par les HR.



**Figure D11 : Expression membranaire des récepteurs à l'histamine sur les pDC primaires**

Une autre étude montre que la spermine bloque l'entrée d'un virus VIH de tropisme CXCR4 grâce à sa fixation sur le corécepteur. Nous avons alors voulu vérifier si dans notre modèle d'activation des pDC, CXCR4 était le récepteur des amines. Nous avons tout d'abord montré que CXCR4 colocalise avec FFN-511, l'agoniste fluorescent de la sérotonine (Figure 5c et d de l'article n°1). D'autre part, l'activation du récepteur aux chimiokines CXCR4 est caractérisée par son endocytose. Nous avons ainsi pu montrer que le CB induisait l'endocytose de CXCR4 après 1h (Figure 5a et b de l'article n°1). Cette expérience a été particulièrement compliquée à mettre en place en raison du fait que le seul anticorps fiable de CXCR4, le clone 12G5, induit l'endocytose de CXCR4. L'expérience a alors été réalisée à 4°C afin de limiter ce phénomène. CXCR4 a été marqué avec un anticorps primaire avant d'être marqué avec un anticorps secondaire soit en extracellulaire soit en intracellulaire. Par ailleurs, on peut noter que 12G5 ne se fixe plus au CXCR4 extracellulaire après fixation des cellules par la PFA. Cette internalisation de CXCR4 en présence de CB traduit donc de sa fixation sur le récepteur. Pour confirmer ces premiers résultats, nous avons effectué des expériences de gene silencing (siRNA) de CXCR4 sur les pDC primaires. Nous avons ainsi pu diminuer l'ARN messager et la protéine de CXCR4 de 80% (Figure Sup 3b et c de l'article n°1). Nous avons ainsi pu évaluer le rôle de CXCR4 lors de

l'inhibition des pDC par les amines. En effet, l'inhibition de CXCR4 par siRNA permet de restaurer l'effet activateur des virus VIH de tropisme CXCR4 mais aussi CCR5 et le virus de la grippe sur les pDC, et cela même en présence de histamine, de CB ou de spermine. D'autre part, nous avons aussi bloqué l'accès de CXCR4 aux amines soit en bloquant l'accès à la poche d'interaction en utilisant l'antagoniste spécifique de CXCR4, l'AMD3100 (Figure 6e de l'article n°1), mais aussi en internalisant CXCR4 en utilisant son ligand naturel CXCL12 (Figure D12). Nous avons observés que l'AMD3100 et le CXCL12 inhibaient totalement l'effet biologique des amines sur les pDC. Tous ces résultats permettent de confirmer que les effets observés des amines sur les pDC sont bien dus à leur fixation sur CXCR4.



**Figure D12 : CXCL12 permet d'inhiber l'effet du CB.** Les cellules pDC humaines primaires ont été pré-incubées pendant 1h à 37°C avec le ligand naturel de CXCR4, le CXCL12, puis incubées avec le CB pendant 1h avant d'être cultivées avec du virus VIH de tropisme X4. (A) Expression de TRAIL membranaire mesurée par cytométrie en flux sur les cellules décrites précédemment. (B) Niveaux d'ARNm d'IFN $\alpha$  et d'IFN $\beta$  mesurée par RT-qPCR sur les pDC décrites précédemment.

Notre étude a permis d'identifier une nouvelle voie de régulation de l'activation des pDC. Ainsi, CXCR4 peut jouer le rôle d'interrupteur de l'activation des pDC ce qui en fait une nouvelle cible thérapeutique.

Il serait alors intéressant de développer des molécules plus spécifiques et plus affines que les amines de notre étude qui auraient pour cible CXCR4. CB est un agoniste de H3R connu depuis 1993 (Kathmann *et al.*, 1993). Beaucoup d'études ont été effectuées sur CB afin de mieux

comprendre le rôle de H3R. Cependant, il a été montré que CB n'est pas spécifique de H3R mais peut aussi se fixer sur H4R (Lim et al., 2009). Les amines inhibent l'activation des pDC à des concentrations de l'ordre du micro-molaire *in vitro*. Les résultats *in vivo* sur la souris ont été obtenus avec les mêmes concentrations d'amines extrapolées à l'organisme entier (Figure 3b de l'article I). En collaboration avec des chimistes de l'unité nous avons donc commencé à synthétiser des molécules qui pourraient être utilisées à des concentrations plus faibles grâce à leur forte affinité sur CXCR4 et qui sont très stables dans le milieu de culture. Ces molécules pourraient également avoir un effet *in vivo* et pourraient être administrées oralement. Dans la revue de l'équipe de Neamati, l'affinité d'un grand nombre de molécules a été testée (Debnath et al., 2013). Il existe ainsi une liste de molécules qui possèdent des affinités de l'ordre du nanomolaire vis-à-vis de CXCR4 notamment des molécules dont la structure est basée sur des motifs para-xylyl-enediamine ou appartenant à des dérivés de l'AMD070 dont la structure est basée sur des motifs tétrahydroquinolines. Il serait particulièrement intéressant de tester ce type de molécules dans notre modèle *in vitro* et *in vivo*.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'activation des pDC peut être à double tranchant pour l'hôte en fonction du microenvironnement de la maladie. Ainsi la régulation des pDC représente une stratégie intéressante dans les maladies virales chroniques, les maladies auto-immunes et toutes les autres maladies dans lesquelles les pDC peuvent être hyperactives.

En effet, chez les patients SLE, l'augmentation des niveaux d'IFN-I dans leur sérum corrèle avec l'expression des marqueurs de progression de la maladie (Guiducci et al., 2010). D'autre part, la suractivation pathologique des pDC et par conséquent la production incontrôlée de l'IFN-I induit de fortes quantités de ligand pro-apoptotique TRAIL. Cette surproduction participe alors à la destruction des tissus environnants. D'autre part, dans les infections virales chroniques et aiguës, la production prolongée de l'IFN-I peut avoir des conséquences dramatiques. Alors que l'IFN joue un rôle essentiel dans le contrôle de la propagation virale, plusieurs études ont montré que dans des modèles de souris infectées par LCMV ou par la grippe, l'IFN participait à la progression de la maladie (Davidson et al., 2014; Teijaro et al., 2013 ; Wilson et al., 2013 ). Il est aussi maintenant admis que l'IFN-I, lors la phase chronique de l'infection par le VIH, a un rôle délétère en induisant une hyperactivation du système immunitaire, puis à son épuisement et enfin à une augmentation massive de la mort des lymphocytes B et T CD4+ due à la surexpression du ligand TRAIL(Gougeon and Herbeuval, 2012 ; Hardy et al., 2007 ; Herbeuval et al., 2005b ; Herbeuval and Shearer, 2007 ; van Grevenynghe et al., 2012).

Il est donc indispensable d'identifier de nouvelles molécules efficaces capables de réguler la production d'interféron de type I lorsqu'il est associé aux pathologies.

A la vue des besoins grandissant de molécules inhibitrices de la production massive d'IFN, de nombreuses stratégies thérapeutiques se sont développées en ciblant diverses étapes de la voie de signalisation de l'IFN (Introduction « III. F. Thérapies anti-interféron »). Ainsi des molécules inhibitrices de TLR, IRK4 et IRF7 ont été développées ainsi que des anticorps mono- et polyclonaux qui ciblent les IFN et leurs récepteurs. D'autres stratégies tendent à inhiber les pDC en activant les récepteurs BDCA2 et ILT-7 sans pour autant avoir des résultats très reproductibles probablement en raison du fait que la compréhension de ce mécanisme n'est pas complètement élucidée. La découverte de CXCR4 comme modulateur de l'activation des pDC permet ainsi de cibler en amont la cascade d'activation des pDC et pas seulement la production d'IFN. D'autre part, CXCR4 est un récepteur membranaire, ce qui facilite l'accès des molécules inhibitrices à leur cible.

Les résultats *in vitro* que nous avons obtenus sont très encourageants. Cependant, le modèle *in vivo* utilisé ne permet pas d'affirmer que la présence d'amines endogènes peut réguler les pDC. En effet, dans notre modèle nous avons injecté de l'histamine ou du CB aux souris avant de les infectées avec un virus de la grippe. Cette expérience permet uniquement de valider par corrélation nos résultats *in vitro*, mais nous ne pouvons pas affirmer que (1) les amines endogènes peuvent avoir un rôle inhibiteur et que (2) cette inhibition passe par CXCR4. Il faudrait en effet, utiliser des souris KO pour CXCR4 qui subiraient une importante décharge d'histamine. Seules des souris chimériques CXCR4<sup>-/-</sup> ont été générées mais les étudier est très difficile. En effet, les souris CXCR4 KO ne sont pas viables, il faut donc utiliser des constructions génétiques (de type CRE-LOX) afin de les générer (Huang *et al.*, 2014; Zou *et al.*, 1998 ). D'autre part, CXCR4 est un récepteur extrêmement important dans un grand nombre de phénomènes biologiques. Ainsi, l'utilisation de souris CXCR4<sup>-/-</sup> ne pourrait probablement pas se faire dans notre étude car les pDC ne pourront plus migrer vers les sites d'inflammation. Cependant, il serait possible d'utiliser des souris qui développent un asthme allergique en réponse à des allergènes (Nials and Uddin, 2008). Nous pourrions ainsi infecter ces souris avec différents virus et tester leur susceptibilité au virus. Dans ces modèles, nous ne pourrions pas bloquer volontairement l'histamine afin de montrer qu'elle est bien responsable de l'inhibition des pDC, cependant l'utilisation d'AMD3100 pourrait avoir un effet sur l'inhibition de la production d'IFN-I et donc sur la réplication virale et ainsi montrer l'implication de CXCR4. Ces modèles seraient tout à fait passionnants à développer.

## IV. QUESTIONS NON RÉVOLUES

### IV.A. LES AMINES ONT ELLES UN RÔLE UNIQUEMENT PROTÉCTEUR ?

Comme précédemment mentionné, pour répondre à toutes nos questions, notamment sur la pertinence physiologique de nos résultats, il faudrait renforcer les études *in vivo*. Dans le modèle que nous avons utilisé dans notre étude, nous pourrions injecter de l'AMD3100 qui bloque l'effet des amines avant de les injecter à leur tour. Cependant, la cinétique d'administration de l'AMD3100 par rapport à l'infection est extrêmement importante compte tenu que cet antagoniste de CXCR4 peut aussi bloquer le chimiotaxisme des cellules et donc leur migration vers le site d'infection. D'autres études montrent au contraire, que l'AMD3100 peut mobiliser certains types cellulaires. Il faudra donc bien évaluer le rôle de l'AMD3100 dans notre système.

D'autre part, il serait aussi intéressant de mieux caractériser l'inhibition des pDC par CXCR4. Ainsi, nous pourrions savoir si les amines ne jouent qu'un rôle protecteur ; c'est à dire bloquer l'activation des pDC en passant par CXCR4 uniquement si elles sont présentes avant l'infection ; ou si elles peuvent réguler une infection déjà engendrée dans l'organisme, dans quel cas elles auraient aussi un rôle curatif. De plus, comme nous bloquons la production de l'IFN-I, qui rappelons-le est aussi un puissant antiviral, il serait aussi intéressant d'évaluer la propagation du virus dans l'organisme et les conséquences que cela pourrait avoir.

### IV.B. PEUT-ON CONSIDÉRER LES AMINES COMME DES LIGANDS BIAISÉS DE CXCR4 ?

#### IV. B. I. Mécanisme d'activation des protéines G hétérotrimériques et des $\beta$ -arrestines par la fixation d'un ligand sur une protéine GPCR

La fixation du ligand sur son récepteur GPCR va induire l'activation des protéines G qui sont couplées au récepteur ou va activer la voie de la  $\beta$ -arrestine. Ces mécanismes d'activation semblent similaires à la plupart des GPCR (notamment aux récepteurs des monoamines et polyamines et de CXCR4).

##### IV. B. I. i. Activation des protéines G

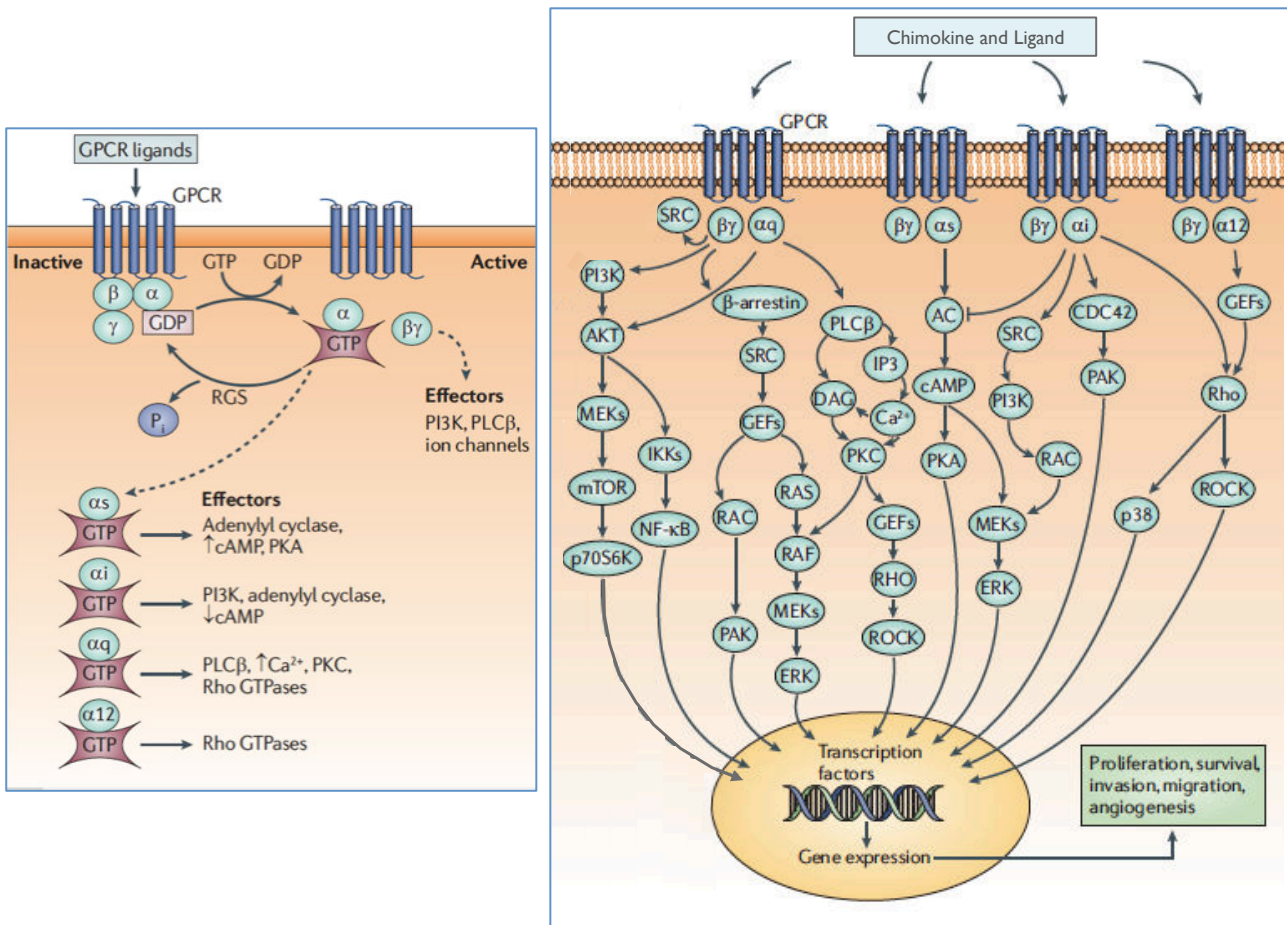
L'activation des protéines G dépendantes de la voie de signalisation des GPCR implique la fixation d'un ligand agoniste et provoque des changements conformationnels dans le récepteur ce qui va promouvoir son interaction avec les protéines G hétérotrimériques ( $G\alpha\beta\gamma$ ).

Il existe un équilibre entre les états inactivés et activés, ce dernier pouvant être converti en un état de signalisation en présence de protéines G hétérotrimériques. La fixation d'un agoniste déplace l'équilibre en direction des états activés, qui sont caractérisés par d'importants changements conformationnels du côté intracellulaire du récepteur. Ainsi, le réarrangement des hélices du côté intracellulaire comprend la rotation de l'hélice VI en même temps qu'un mouvement de l'hélice V, comme le propose le « global toggle-switch mechanism » (Nygaard *et al.*, 2009; Schwartz *et al.*, 2006). De plus, les mouvements globaux des hélices pendant l'activation sont accompagnés par des micro-changements locaux dans la partie intracellulaire des GPCR. Les micro-changements sont caractérisés par des changements de rotamères dans des chaînes très conservées et stabilisent les mouvements globaux des hélices et aident à la fixation de la protéine G au GPCR.

Les protéines G ont un rôle crucial afin de définir la spécificité et les caractéristiques de la réponse cellulaire après activation du GPCR par son ligand. Les protéines G hétérotrimériques sont composées de trois sous-unités,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , et leur activation dépend de la capacité de la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G ( $G\alpha$ ) à établir un cycle entre une conformation inactive liée à la GDP qui est fixée à un récepteur inactivé et une conformation active liée à la GTP qui peut moduler l'activité des protéines effectrices en aval (Oldham and Hamm, 2006). Le GPCR contient un motif NSXXNPXXY dans l'hélice VII et un motif DRY (un motif hautement conservé Asp-Arg-Tyr) sur le bord cytoplasmique de l'hélice III, motifs qui sont importants pour la stabilisation et l'activation des protéines G (Kristiansen, 2004). Le domaine GTPase permet d'hydrolyser la GDP en GTP ce qui décroît l'affinité de  $G\alpha$  envers  $G\beta/\gamma$  et provoque la dissociation du complexe et fournit la surface de fixation pour le dimère  $G\beta/\gamma$ , le GPCR et les protéines effectrices. Qin *et al.*, ont montré que les protéines G interagissent avec le GPCR avant même la fixation du ligand, on parle du modèle de « pré-assemblage ». De façon plus intéressante, ils ont aussi montré que l'addition d'un ligand altérerait la mobilisation de la protéine  $G\alpha$ , suggérant que le pré-assemblage induit des changements conformationnels distincts de l'activation du récepteur (Qin *et al.*, 2011). L'activation du récepteur ouvre la poche de la face cytoplasmique du GPCR pour permettre la fixation du C-terminal de la  $G\alpha$ . La sous-unité  $G\beta/\gamma$  peut aussi se fixer aux récepteurs et est nécessaire pour stabiliser l'interface entre le récepteur et la  $G\alpha$ . Ainsi, la dissociation des protéines G permet leur interaction et l'activation d'une variété d'effecteurs en aval comme des enzymes (PI3K et adénylate cyclase) ou des canaux ioniques pour générer des seconds messagers (cAMP).

Chez les humains, il existe 21 sous-unités  $G\alpha$  codées par 16 gènes, 6 sous-unités  $G\beta$  codées par 5 gènes et 12 sous-unités  $G\gamma$  (Downes and Gautam, 1999). Les hétérotrimères sont typiquement divisés en 4 classes principalement basés sur la similarités des séquences primaires

des sous-unités  $G\alpha$  :  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_{q/11}$  et  $G\alpha_{12/13}$ . Les différentes sous-unités  $G\alpha$  et  $G\beta/\gamma$  vont se fixer à différents effecteurs en aval, comme résumé dans la figure D13, afin d'engendrer des signaux différents et très variés.

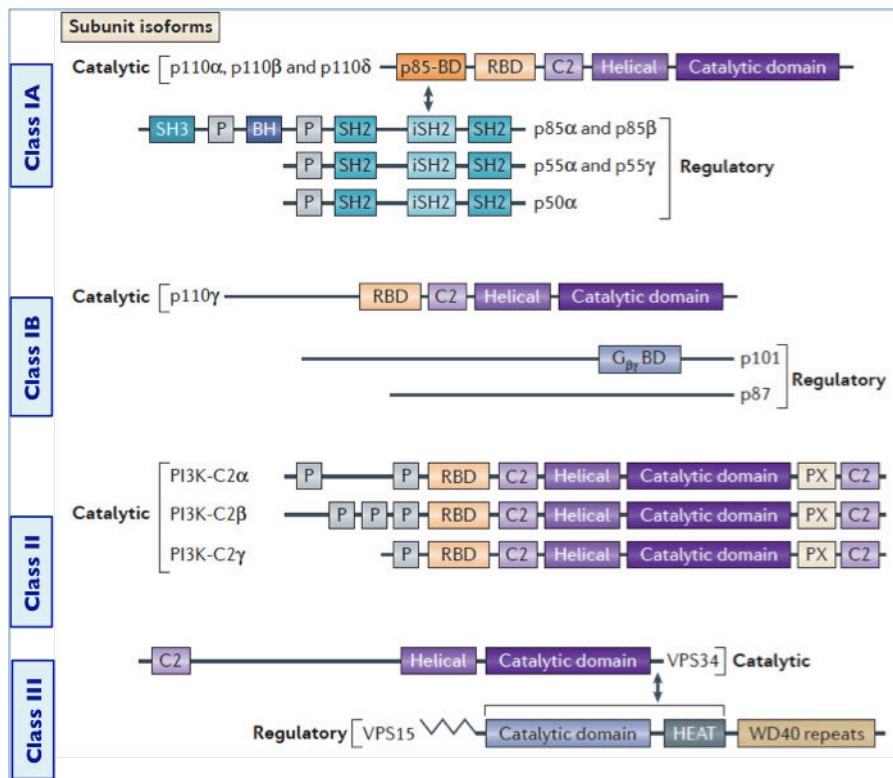


**Figure D13 : Mécanisme d'activation des protéines G.**  
 Modifié à partir de (Lappano and Maggiolini, 2011)

Comme nous pouvons le voir sur la figure D13, la voie de signalisation en aval de l'activation des différentes sous-unités des protéines G va induire l'activation d'un très grand nombre d'effecteurs qui vont permettre l'expression de gènes aboutissant à divers signaux. On peut nommer par exemple la voie de IP3 qui régule le calcium, la voie de JAK, la voie PI3K/AKT et la voie ERK1/2. Nous allons ici détailler brièvement uniquement la voie de PI3K, qui va nous intéresser par la suite. La voie de signalisation de PI3K est elle aussi extrêmement complexe et n'est pas complètement élucidée.

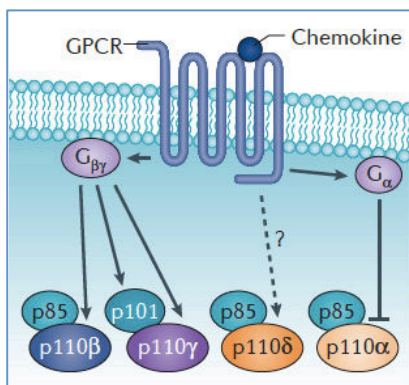
Les membres de la famille de PI3K sont des enzymes qui catalysent la phosphorylation de un ou plusieurs phospholipides inositol d'un cycle inositol. A la fois les substrats et les produits de ces réactions sont des phospholipides membranaires et l'action des PI3K permet de générer des messagers spécifiques. Il existe huit PI3K dans les cellules de mammifères, classées dans trois familles : 4 isoformes de classe I ( $PI3K\alpha,\beta,\gamma,\delta$ ), 3 isoformes de classe II ( $PI3K\epsilon,\zeta,\eta$ ) et une

isoforme de classe III. Chaque isoforme est constituée d'une sous-unité régulatrice et d'une sous-unité catalytique.



**Figure D14 : La famille de PI3K comprend plusieurs classes et isoformes**  
Modifié à partir de (Thorpe et al., 2015)

Il a été pensé pendant longtemps que les GPCR activaient uniquement les isoformes de classe IB (p110 $\gamma$ ) à travers l'isoforme régulatrice p87 ou p101, cependant, il a récemment été montré que les GPCR pouvaient aussi activer les isoformes de classe IA et notamment la p110 $\beta$  (Dbouk et al., 2012) mais aussi la p110 $\delta$  même si elle n'interagit pas directement avec les protéine GPCR et que la voie de signalisation est non connue (Saudemont et al., 2009).

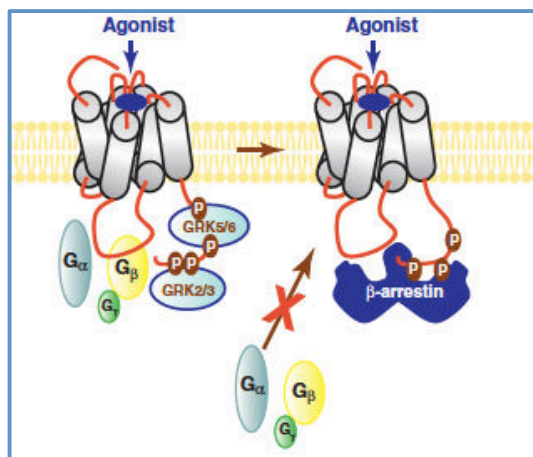


**Figure D15 : Rôle divergent des sous-unités catalytiques et régulatrices des différentes isoformes en fonction du signal**  
Modifié à partir de (Thorpe et al., 2015)



## V. B. I. ii. Activation de la voie de la $\beta$ -arrestine

Un seul récepteur peut potentiellement se coupler à plusieurs protéines G, ainsi la cellule a mis en place un mécanisme de désensibilisation pour éteindre cette voie de signalisation afin d'éviter des effets délétères d'un signal prolongé (Shukla *et al.*, 2011).



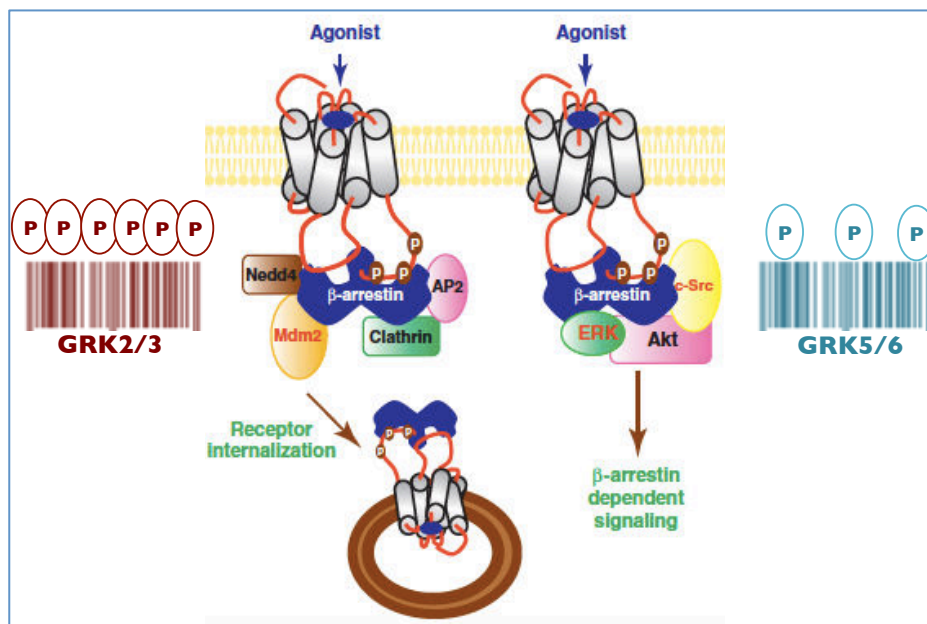
**Figure D16 : Désensibilisation des GPCR médiée par les  $\beta$ -arrestines**

*Modifié à partir de (Shukla *et al.*, 2011)*

La désensibilisation des GPCR se déroule en deux étapes. Tout d'abord, le complexe GPCR/agoniste est phosphorylé par les GRK (G protein-coupled receptor kinases) sur leur extrémité C-terminale mais aussi sur leurs boucles intracellulaires. Les GRK sont une famille de sept kinases sérines/thréonine (GRK1 – GRK7) (Benovic *et al.*, 1989). Quatre GRK (GRK2, -3, -5, -6) sont responsables de la phosphorylation de la plupart des GPCR. La GRK2/3 semble jouer un rôle dans la phosphorylation du récepteur, l'internalisation du récepteur et le recrutement de la  $\beta$ -arrestine mais pas l'induction de la voie de signalisation, contrairement à GRK5/6 qui est indispensable à l'induction de la voie de signalisation de ERK1/2. Les deux types de phosphorylation (par GRK2/3 et GRK5/6) contribuent à la désensibilisation des GPCR. Ces différentes phosphorylations, qui ont lieu sur l'extrémité C-terminal du GPCR, ressemblent à des « codes barres » permettent d'affecter différemment la topologie de la face intracellulaire du récepteur et ainsi adopter une configuration pour recruter les  $\beta$ -arrestines. Ainsi, ces dernières adopteraient elles aussi des conformations différentes qui l'engageraient dans différentes voies de signalisation (désensibilisation, internalisation, signalisation). De façon intéressante, on peut noter que les différents sous-types de GRK ont des fonctions régulatrices spécifiques de chaque GPCR ; mais aussi au sein d'une même GPCR, comme l'a montré une étude sur CXCR4 qui indique que la phosphorylation spécifique d'un site par des kinases peut amener à la régulation positive ou négative de CXCR4 (Busillo *et al.*, 2010). Il a aussi été montré qu'une ubiquitination (modifications covalentes) des  $\beta$ -arrestines détermine de la stabilité du complexe GPCR- $\beta$ -arrestine (Oakley *et al.*, 2001). Ainsi, l'ubiquitination de la  $\beta$ -arrestine 2 par la ligase ubiquitine E3 Mdm2 joue un rôle

essentiel dans l'endocytose des GPCR après fixation du ligand. Parallèlement, la  $\beta$ -arrestine 2 peut aussi être un adaptateur aux déubiquitinasés (USP20), qui vont augmenter la voie du recyclage du récepteur et de la resensibilisation.

La deuxième étape de la désensibilisation implique le recrutement des protéines adaptatrices multifonctionnelles appelées arrestines pour activer et phosphoryler les récepteurs. Le recrutement des  $\beta$ -arrestines gêne stériquement la fixation prolongée des protéines G, ce qui induit la désensibilisation. Il existe quatre membres dans la famille des arrestines : arrestine 1 (visual arrestine), arrestine 2 ( $\beta$ -arrestine 1), arrestine 3 ( $\beta$ -arrestine 2) et arrestine 4 (cone arrestine). Les deux isoformes de  $\beta$ -arrestines sont exprimées de façon ubiquitaire et sont celles qui régulent la majorité des GPCR. Elles sont formées d'un domaine N et C-terminal reliés par des feuilletés  $\beta$  antiparallèles (Lefkowitz, 1998).



**Figure D17: Nouveau rôle de la  $\beta$ -arrestine en tant qu'adaptateur d'endocytose et de la voie de signalisation des GPCR.**

*Modifié à partir de (Shukla et al., 2011)*

En plus de leur rôle dans la désensibilisation des GPCR, les  $\beta$ -arrestines peuvent aussi interagir avec et servir d'adaptateurs à des composants clés de la machinerie d'endocytose afin d'internaliser le récepteur. Dans ces protéines clés on retrouve la chaîne lourde de la clathrine, l'adaptine  $\beta 2$  de la protéine adaptatrice AP2, la petite protéine G ARF6 (ADP-ribosylation factor 6) et la protéine de fusion N-ethylmaleimidesensitive. L'internalisation des GPCR médiée par la clathrine dépendante de la  $\beta$ -arrestine est le mécanisme général pour la plupart des GPCR (McDonald and Lefkowitz, 2001). L'ubiquitination de la  $\beta$ -arrestine permet d'augmenter l'interaction avec la clathrine, le GPCR et les MAPK. Il a longtemps été pensé que l'endocytose du récepteur permettait d'arrêter sa signalisation, cependant il est maintenant clair que le signal de

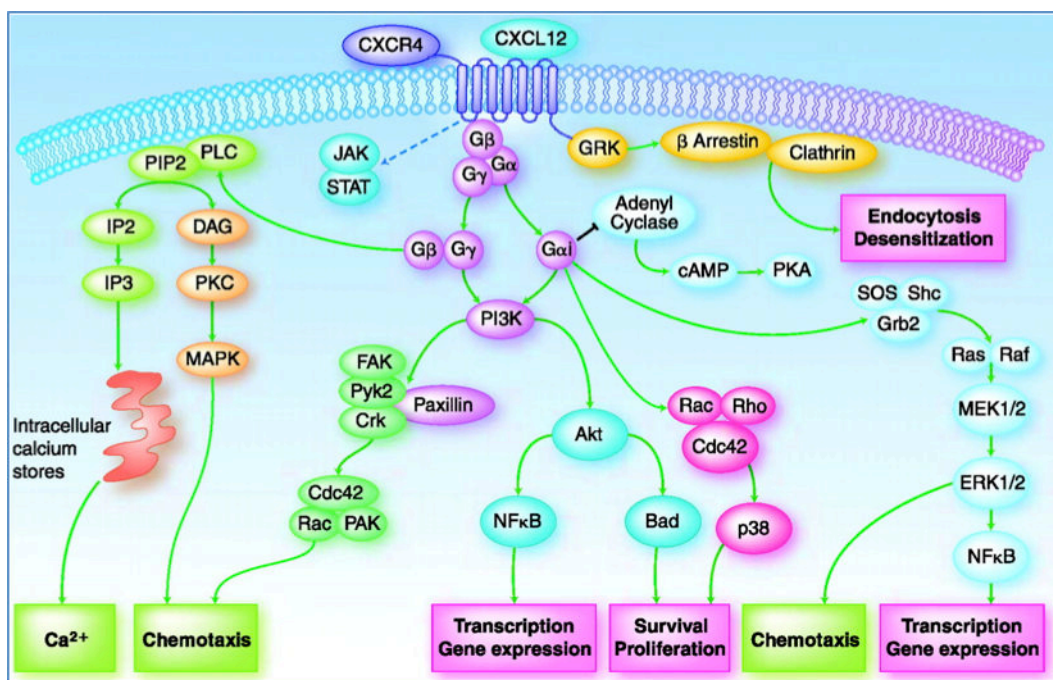
transduction persiste après l'internalisation et que les  $\beta$ -arrestines se lient à différentes molécules régulatrices activant des voies de signalisation. Ces complexes GPCR: $\beta$ -arrestine se retrouvent dans des endosomes que l'on nomme des signalosomes.

De plus, les  $\beta$ -arrestines peuvent aussi interagir avec AKT, PI3K et PDE4 (phosphodiesterase 4) mais aussi JAK2 (Marrero *et al.*, 1995) en fonction des récepteurs et ainsi d'activer diverses voies d'activation.

#### IV. B. 2. Les voies de signalisation induites par les amines dans les pDC

Aucune étude ne montre que les amines se fixent spécifiquement sur le CXCR4 des pDC ; en effet, les amines ont une affinité pour CXCR4 quelque soit les cellules sur lesquelles elles sont exprimées. Cependant, nous pouvons penser que la voie de signalisation de CXCR4 en aval de la fixation des amines est elle, propre à chaque type cellulaire et donc que l'effet biologique des amines sur le CXCR4 des pDC est spécifique de ce type cellulaire.

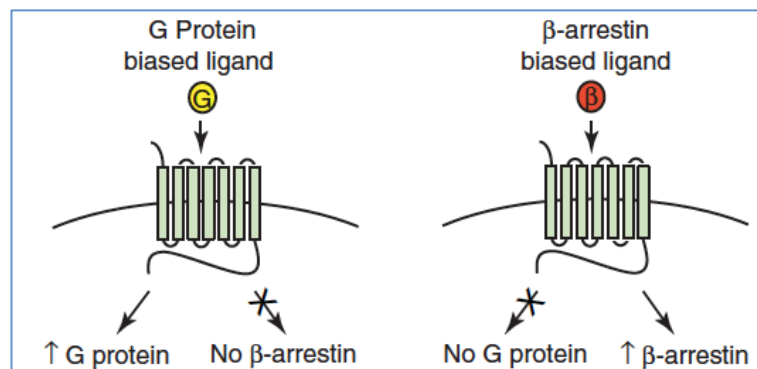
La figure D18 est une représentation générale et simplifiée de la voie d'activation de protéines G couplées à CXCR4 après fixation de son ligand CXCL12. Il semblerait que CXCR4 soit couplé à la protéine  $G\alpha$  à la  $G_{13}$  (Tan *et al.*, 2006) ainsi qu'à la  $\beta$ -arrestine 2 (Cheng *et al.*, 2000).



**Figure D18 : Les voies de signalisation de CXCR4**

*Modifié à partir de (Teicher and Fricker, 2010)*

Il existe plusieurs types de ligands qui se fixent à CXCR4 : le ligand naturel CXCL12, les antagonistes comme l'AMD3100 dont il bloque toutes les voies de signalisation et les ligands biaisés. Les ligands biaisés sont des agonistes des récepteurs qui activent sélectivement la voie de signalisation dépendante des protéines G ou dépendante de la  $\beta$ -arrestine. L'activation d'une des voies de signalisation peut se traduire par des effets physiologiques bénéfiques ou indésirables, ainsi le développement d'agonistes biaisés pourrait avoir des intérêts thérapeutiques. Cependant, la poche de fixation de ces agonistes biaisés dans leur récepteur reste à être élucidée, car logiquement il semblerait qu'elle soit différente de celle du ligand non-biaisés (Reiter *et al.*, 2012; Whalen *et al.*, 2011 ).



**Figure D19 : Induction des différentes voies de signalisation par des ligands biaisés.** Le ligand biaisé active soit la voie des protéines G et inhibe la voie des  $\beta$ -arrestines ou soit la désensibilisation, l'internalisation et la signalisation par l'induction des  $\beta$ -arrestines en inhibant la voie des protéines G  
*Modifié à partir de (Reiter et al., 2012; Whalen et al., 2011 )*

La classe des pepducines qui contrôlent allostériquement CXCR4 et peuvent activer uniquement certaines voies de CXCR4 (soit la voie des  $\beta$ -arrestines ou la voie des protéines G). Les pepducines sont des peptides de 10 à 37 acides aminés dont la séquence est basée sur les boucles intracellulaires de CXCR4. L'équipe de M. Bouvier au Canada a montré qu'une pepducine, l'ATI-2341, pouvait activer la  $G\alpha_i$  mais pas la  $G\alpha_{13}$ , de la même façon elle pouvait activer la voie de PKC mais pas celle de la  $\beta$ -arrestine ni celle de GRK2 ou GRK3 (Quoyer *et al.*, 2013). L'étude s'est principalement basée sur des résultats de BRET obtenus grâce à diverses constructions protéiques dans des HEK 293T qui permettent d'identifier spécifiquement l'induction des différents acteurs en aval de la fixation du ligand sur CXCR4. L'ATI-2341 agit de façon sélective sur la voie de signalisation induite. Ainsi, il existe des ligands qui peuvent moduler différenciellement l'activité des différentes voies de signalisation engagées par un même récepteur que l'on nomme ligands biaisés. Cette sélectivité fonctionnelle est permise grâce à la capacité des ligands à induire ou stabiliser une conformation particulière du récepteur qui va avoir différentes affinités pour les effecteurs en aval.

D'autre part, on peut noter que ni l'AMD3100 ni CXCL12 ne bloque l'activation virale des pDC, même si ces deux molécules induisent probablement des effets différents sur leurs cellules cibles. Or l'AMD3100 est un antagoniste de CXCR4. CXCL12, en tant que ligand naturel, active toutes les voies de signalisation de CXCR4. Nos molécules aminées sont capables d'induire une réponse encore différente ; elles induisent l'internalisation de CXCR4, cependant nous n'avons pas pu identifier si des voies de signalisation de CXCR4 étaient activées mais nous savons que lorsque toutes les voies sont activées comme avec CXCL12, il n'y a pas de répercussion sur l'inhibition de l'activation des pDC. Pour toutes ces raisons nous pouvons émettre l'hypothèse que les amines agissent comme des ligands biaisés sur CXCR4. Cependant, avant d'affirmer que les amines sont des ligands biaisés de CXCR4, il faudrait des expériences qui (1) prouvent par d'autres moyens que par l'immunofluorescence que les amines se fixent à CXCR4 et (2) indiquent les voies spécifiquement activées par nos amines :

- Nous avons pu montrer par immunofluorescence que les amines internalisent CXCR4, ce qui fournit une preuve directe de leur fixation sur le récepteur. Cependant, l'immunofluorescence de CXCR4 est controversé car CXCR4 est très sensible à la fixation de son anticorps 12G5. Ainsi, d'autres expériences de fixation des amines sur CXCR4 sont nécessaires (Brelot *et al.*, 2000; Fricker *et al.*, 2006). On peut citer par exemple :
  - les expériences de flux calcique : les cellules sont chargées d'un indicateur de calcium, comme le Fluo-4-AM, puis mises en présence des différentes molécules à tester à différentes concentrations avant que la fluorescence ne soit testée.
  - les expériences de radioactivité : les cellules sont mises en présence des différentes molécules à tester à différentes concentrations avec du ligand CXCL12 radioactif <sup>125</sup>I-SDF-1 $\alpha$  avant que la radioactivité ne soit testée.
- Il serait intéressant de tester l'ATI-2341 dans notre modèle de pDC afin de savoir si les voies induites par un ligand biaisé connu peuvent être inhibitrices de l'activation des pDC. D'autre part, grâce à leur construction protéique nous pourrions savoir quelles sont les voies induites par des petites molécules comme les amines utilisées dans notre étude.

Si nous pouvons alors déterminer la voie de signalisation induite par les amines, nous pourrions aussi déterminer l'importance de cette voie dans d'autres types cellulaires. Nous pourrions alors émettre l'hypothèse, par exemple, que l'action des amines sur CXCR4 n'affecte que les cellules qui sont capables d'endocytose, comme les pDC mais aussi les cDC, les macrophages et les monocytes.

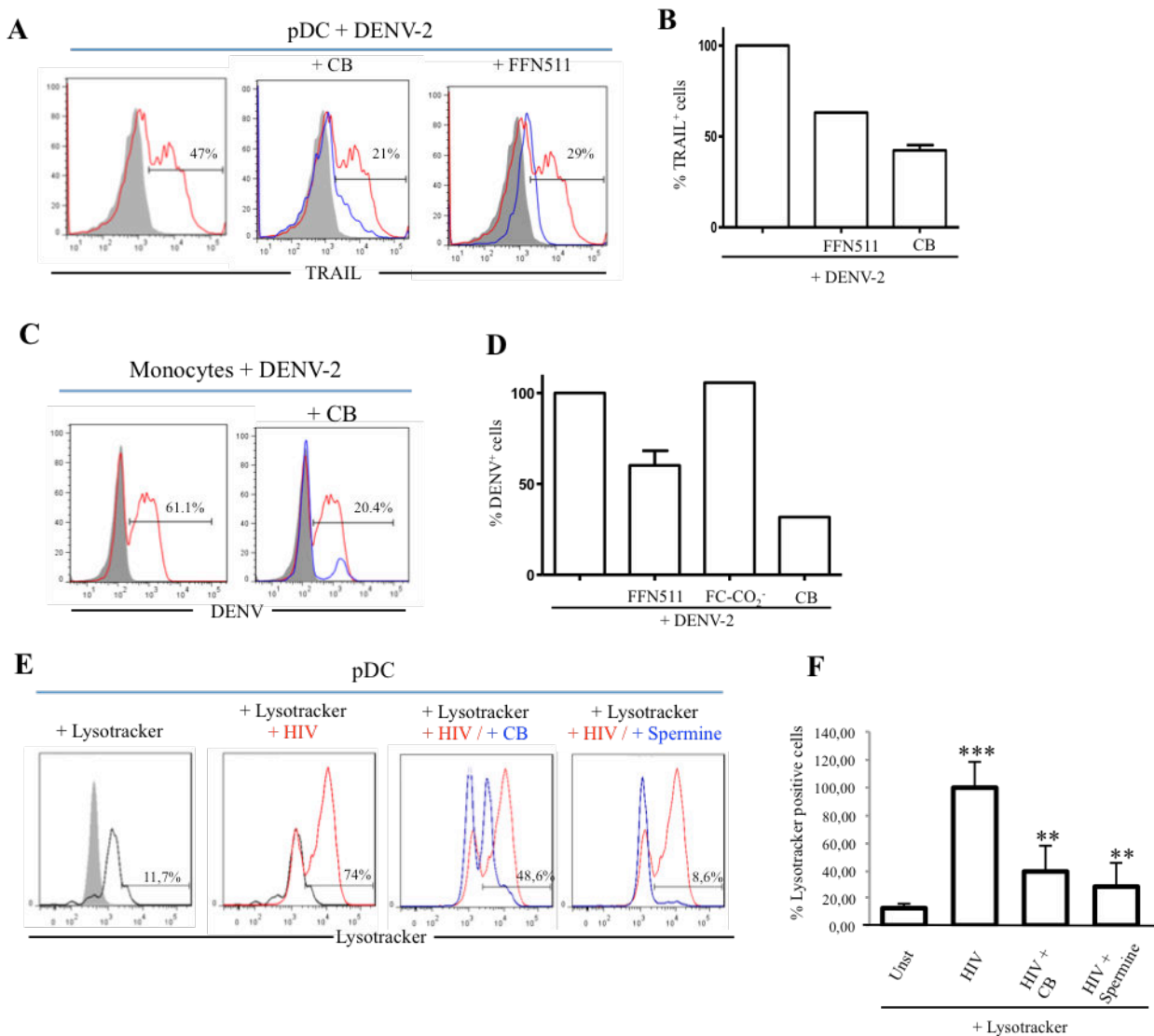
#### IV.C. QUEL EST LE RÔLE DES AMINES SUR L'ACIDIFICATION DES ENDOSOMES ?

Nous avons utilisé un modèle bien connu dans notre laboratoire : l'infection des monocytes par la dengue (DENV-2) (Gandini *et al.*, 2013). Les monocytes sont en effet infectés par la dengue lors de l'endocytose du virus. D'autre part, cette infection repose exclusivement sur l'acidification des endosomes. Ainsi, nous avons mis en place un deuxième modèle viral, dans un autre type cellulaire, dans lequel l'acidification est nécessaire à l'activation des cellules.

Nous avons alors testé nos amines sur ce nouveau modèle de monocytes qui expriment aussi CXCR4 et nous avons pu montrer que la réplication virale de la dengue était inhibée. Nous voulions vérifier si l'acidification endosomale était changée. Grâce à la technique du lysotracker, qui permet de déterminer les variations de pH dans les endosomes intracellulaires, nous avons montré que les endosomes n'étaient plus acidifiés en présence des amines. A la vue de ce résultat, nous avons réitéré l'expérience dans les pDC. Nous avons ainsi pu montrer que l'acidification endosomale des pDC était aussi bloquée (Figure D20).

Ces résultats nous permettent de valider notre hypothèse. La fixation des amines sur CXCR4 induit un signal spécifique qui bloque totalement l'activation des cellules dès la formation des endosomes acides nécessaires à l'induction des voies de signalisation. En effet, il est maintenant établi que l'activation de TLR7 nécessite l'acidification de l'endosome dans lequel il se trouve afin de une part d'être clivé pour devenir actif et d'autre part afin de dégrader les particules virales pour que le ligand de TLR7 (en l'occurrence le ssRNA) soit disponible (Ewald *et al.*, 2008 ; Park *et al.*, 2008); (Maschalidi *et al.*, 2012; Sepulveda *et al.*, 2009).

Les expériences que nous avons effectuées permettent de confirmer le rôle des amines dans l'inhibition de l'activation des cellules qui nécessite l'endocytose des pathogènes. Nous pourrions aussi vérifier la validité de cette hypothèse en utilisant la stimulation d'un récepteur TLR extracellulaire, comme le TLR4 exprimé par les monocytes mais aussi les macrophages et les DC, qui ne nécessite pas l'endocytose afin d'être activé.



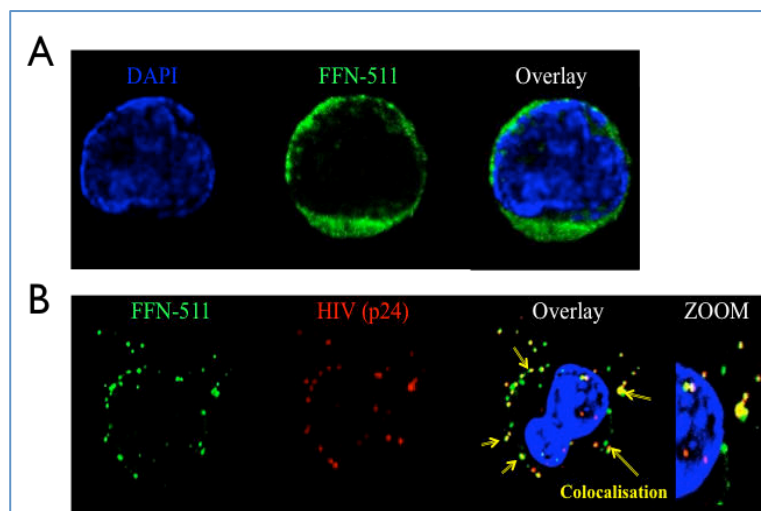
**Figure D20 : Le lysotracker indique qu'il n'y a plus d'acidification des endosomes dans les monocytes et les pDC stimulés par un virus après pré-incubation avec des amines. (A)** La dengue induit l'expression de TRAIL à la surface des pDC qui est inhibée en présence de CB et du FFN511. (B) Pourcentage de pDC qui exprime TRAIL après stimulation avec un virus de la dengue. (C) La réplication virale de la dengue dans les monocytes est bloquée en présence de CB. (D) L'infection des monocytes par la dengue est inhibée en présence de FFN511 et du CB, mais pas en présence du FC-CO<sub>2</sub>. (E) et (F) L'acidification des endosomes de pDC stimulées par la VIH est bloquée en présence de CB et de la spermine.

#### IV. D. QUEL EST LE MÉCANISME POTENTIEL PAR LEQUEL L'ACTIVATION DE CXCR4 BLOQUE L'ACTIVATION DES PDC ?

Tous les résultats précédents permettent de mieux comprendre l'action des amines sur les pDC et le rôle de CXCR4 dans l'inhibition de l'activation virale de ces cellules. Cependant, nous n'avons pas pu déterminer quel est le mécanisme permettant à CXCR4 de bloquer totalement la réponse des pDC.



Comme nous avons pu montrer que les amines jouaient un rôle sur l'acidification des endosomes, nous avons voulu déterminer la localisation de ces amines après leur fixation sur CXCR4. Grâce à la caractéristique de fluorescence du FFN-511, nous avons pu observer que le FFN-511 était diffus dans des cellules non stimulées mais formait des points qui colocalisent avec le virus du VIH, dans les cellules cultivées avec le virus, probablement dans les endosomes.



**Figure D21 : Localisation de FFN-511 dans des cellules non stimulées (A) ou stimulées avec du VIH (B)**

Nous nous sommes alors demandé si une grande quantité de composés aminés pouvait capter suffisamment de protons pour modifier le pH des endosomes. Or, d'après le pKa des amines, à pH physiologique, elles sont déjà protonées, elles ne peuvent donc plus capter de protons ; d'autre part les concentrations sont trop faibles pour avoir un quelconque rôle sur l'inhibition de l'acidification.

Nous avons cherché s'il existait des molécules communes à la voie de signalisation de CXCR4 et des TLR. Il s'est avéré que PI3K était une molécule commune aux deux voies. En effet, PI3K est induit par différentes protéines G couplées à CXCR4 mais aussi par les  $\beta$ -arrestines comme détaillé précédemment dans la discussion « IV. B. I. Mécanisme d'activation des protéines G hétérotrimériques et des  $\beta$ -arrestines par la fixation d'un ligand sur une protéine GPCR » ; cependant aucune autre étude n'a été effectuée dans les pDC. D'autre part, PI3K est indispensable à la translocation d'IRF7 dans les pDC (Guiducci *et al.*, 2008). Nous savons aussi que PI3K interagit directement avec MyD88 après stimulation de TLR4 (Ojaniemi *et al.*, 2003). Comme nous l'avons vu précédemment, il existe un grand nombre de sous-unités de PI3K qui peuvent être activées par différents récepteurs et cette liste n'est probablement exhaustive. A l'heure actuelle, il a été montré que la sous-unité p110 $\delta$  de PI3K peut être activée en aval de TIRAP-MyD88 (pour TLR2 et TLR4) ou de TRAM-TRIF (pour TLR4 et TLR3) ; mais aussi, comme le montre une seule autre étude, la sous-unité p110 $\gamma$  de PI3K activée par la voie de TLR/IL-1R (Schmid *et al.*, 2011). Dans les pDC, il semblerait que la sous-unité régulatrice p85 $\alpha$  et la sous-unité p110 $\delta$  soient majoritaires



(Guiducci *et al.*, 2008). Ainsi, la voie de signalisation de PI3K peut être activées par différents ligands des TLR et peut agir comme un régulateur positif ou négatif de la réponse TLR en fonction du type cellulaire et du ligand engagé (Fukao and Koyasu, 2003; Troutman *et al.*, 2012).

Ainsi, l'activation de CXCR4 recruterait PI3K qui ne serait alors plus disponible dans la signalisation de TLR. Cependant, nous n'avons jamais pu obtenir des résultats reproductibles en FACS sur les pDC, lorsque nous regardions la phosphorylation d'AKT spécifique de la phosphorylation de PI3K (Ser473). En effet, la voie de signalisation de CXCR4 est très sensible. La fenêtre d'activation de PI3K dans la voie de CXCR4 est courte ; la cinétique est donc primordiale, mais elle semble varier en fonction des donneurs et de l'environnement. Afin de palier à ces problèmes, nous avons tenté d'effectuer des western blots de **phospho-PI3K** p85 (Tyr458)/p55 (Tyr199) mais aussi de **phospho-AKT** (Ser473) et de **phospho-p42/44 MAPK (ERK1/2)** (Thr202/Tyr204), sur la lignée cellulaire des pDC, les Gen2.2, qui n'a pas donné de résultats plus satisfaisants. Nous avons alors effectué des expériences de quantification de phosphorylation protéique par **PathScan** avec des pDC et des Gen2.2, qui permet de cribler la phosphorylation de 16 protéines dans la voie de signalisation d'AKT. Malheureusement, probablement dû à des raisons techniques, l'expérience n'a donné aucun résultat exploitable.

Le mécanisme probable détaillé précédemment semble intéressant, cependant la phosphorylation de PI3K, même si c'est un mécanisme précoce dans l'activation des pDC, est en aval de la voie de signalisation de TLR. Or, nous savons que l'acidification des endosomes est elle également bloquée. Donc sauf si le recrutement de PI3K par les TLR induit l'acidification des endosomes (ce qui n'a jamais été montré), le mécanisme d'action des amines est encore plus en amont. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'activation de CXCR4 par les amines induit un trafficking endosomal qui pourrait altérer le trafficking des endosomes contenant TLR7. En effet, CXCR4 est endocyté lorsque la  $\beta$ -arrestine est activée. Il a été montré qu'après stimulation par CXCL12, CXCR4 colocalise avec EEA1, Rab5, Rab4 et Rab11 (des marqueurs d'endosomes précoce et de recyclage) mais pas avec LAMP1 (Pelekanos *et al.*, 2014). Deux zones de CXCR4 semblent essentielles au recrutement de la  $\beta$ -arrestine afin que CXCR4 soit endocyté : la queue C-terminale et la troisième boucle intracellulaire. Nous avons montré par microscopie que le CB endocytait CXCR4, ce qui nous permet de penser que la voie de la  $\beta$ -arrestine est activée par les amines ; or CXCL12 endocyte aussi CXCR4 mais n'inhibe pas les pDC. Nous pourrions alors imaginer que les amines créent une nouvelle activation spécifique de CXCR4, qui induirait des endosomes différents de ceux de CXCL12, ce qui altérerait soit le déplacement vésiculaire des endosomes possédant TLR7, soit qui forcerait les virus à se retrouver dans des endosomes différents de ceux nécessaires à leur activation (par exemple qui ne possèderaient pas TLR7 ou qui seraient des endosomes de recyclage...) ou encore qui bloqueraient CXCR4 à l'intérieur de la

cellules contrairement à CXCL12 avec qui CXCR4 est endocyté avant d'être recyclé en membrane.

Comme indiqué précédemment, la fixation de CXCL12 sur son récepteur CXCR4 induit l'activation de la voie de signalisation dépendante de  $G\alpha_i$  ainsi que celle de la  $\beta$ -arrestine. De plus, il a été montré que la  $\beta$ -arrestine était impliquée dans la réorganisation du cytosquelette et les signaux anti-apoptotiques. Le syndrome de WHIM (Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections et Myelokathexis) (SW) est une rare combinaison d'immunodéficiences induite par le dysfonctionnement de CXCR4, présent de façon transdominante (Chow *et al.*, 2010; Hernandez *et al.*, 2003). Ce dysfonctionnement est lié à des mutations dans les 10 à 19 acides aminés de la queue C-terminale de CXCR4 qui provoque des réponses importantes et prolongées dépendantes de la protéine G et de la  $\beta$ -arrestine. Les cellules issues de ces patients présentent ainsi un « gain de fonction » en faveur de CXCL12. Les patients avec un SW sont hautement susceptibles à l'infection par un virus à ADN, le papilloma virus humain (HPV), mais pas à d'autres infections, indiquant que cette susceptibilité pourrait être due aux dysfonctionnements de la voie de signalisation CXCR4/CXCL12. Les virus HPV infectent les cellules épithéliales et peuvent se manifester par la présence de lésions et qui dans de rares cas (principalement associés à des virus à haut risque comme HPV16 ou 18), peuvent évoluer en cancers. Les patients atteints du SW sont sujets à des infections chroniques et sévères par HPV et présentent un grand nombre de lésions qui se transforment souvent en cancers. Par ailleurs, il a été montré que ces patients atteints du SW et infectés par HPV présentaient une diminution du nombre de mDC et pDC circulantes ce qui pourrait expliquer la pathogénie d'HPV (Tassone *et al.*, 2010), même si les cellules immunitaires sont fonctionnelles et peuvent contrôler l'infection *in vitro* (Handisurya *et al.*, 2010). Il a été montré que le ligand CXCL12, présent constitutivement sur les fibroblastes, les cellules dendritiques et endothéliales de la peau, était hautement présent dans les lésions provoquées par HPV notamment dans les kératinocytes (Balabanian *et al.*, 2005). Les kératinocytes primaires n'expriment pas CXCL12 ; cependant ils la retiennent à leur surface lorsqu'ils sont immortalisés par un virus HPV à haut risque. De plus, le rôle positif du gain de fonction de CXCR4 sur la capacité oncogène d'HPV a été montré sur des kératinocytes qui deviennent transformés lorsqu'ils expriment un mutant de CXCR4 (Chow *et al.*, 2010).

Dans le syndrome de WHIM, le récepteur CXCR4, étant hyperfonctionnel car il n'est jamais endocyté et reste actif constamment, il serait intéressant de savoir si nos amines sont toujours fonctionnelles dans un tel modèle.

## **V. CHALLENGE TECHNOLOGIQUE : LE siRNA DANS DES PDC**

### **PRIMAIRES**

#### **V. A. GÉNÉRALITÉS SUR LE siRNA**

Le membre de la famille des TLR endosomaux, TLR7, peut à priori reconnaître les siRNA (small-interfering RNA) et les shRNA (short hairpin RNA) et donc induire une réponse de type IFN. Ceci rend difficile les expériences d'inhibition de l'expression des protéines dans les pDC (Robbins *et al.*, 2007). Les ARN interférents (RNAi) ont été décrit en 1998, par Andrew Fire et Craig Mello, dans un modèle de *Caenorhabditis Elegans*, dans lequel l'injection de double brin d'ARN (dsRNA) a permis la dégradation de l'ARNm complémentaire et donc l'inhibition de l'expression du gène correspondant (Fire *et al.*, 1998).

Lorsque des dsRNA sont introduits dans le cytoplasme, ils sont clivés par une enzyme RNase III, connue sous le nom de DICER, en un dsRNA de 21 nucléotides comportant une avancée de deux nucléotides en 3' et 5', appelé petit ARN interférent (siRNA). Le siRNA, alors double brin, va être reconnu par le complexe RISC (RNA inducer silencing complex). La protéine Argonaute, qui fait partie du complexe RISC, va débobiner le siRNA ainsi les deux brins du siRNA vont être séparés afin que le brin sens du siRNA soit dégradé et que seul le brin anti-sens se complexe à RISC. Ce complexe activé va pouvoir reconnaître et se fixer sur son transcrit cible, un ARN messager, par complémentarité de base. L'ARNm cible va être coupé au milieu de la zone de complémentarité, 10 nucléotides en amont du 5' du siRNA. Il va ainsi y avoir plusieurs cycles de découpes de l'ARNm avec l'aide d'une hélicase à ARN dépendante de l'ATP. Cela va avoir pour conséquence sa dégradation et donc l'inhibition de l'expression de la protéine correspondante. En théorie, ce phénomène peut assurer un effet thérapeutique pendant 3 à 7 jours dans les cellules en division et jusqu'à quelques semaines dans les cellules qui ne se divisent pas. En pratique, le siRNA est utilisé à des doses trop faibles ou est dégradé par la cellule, ainsi l'administration répétée est nécessaire pour avoir un effet sur le long terme (Meister and Tuschl, 2004).

Comme nous l'avons vu précédemment, les ARN peuvent être reconnus par le TLR7 présent dans les pDC, tout comme les siRNA, on parle alors de siRNA immunostimulateurs (Marques and Williams, 2005). Plusieurs études ont tenté d'évaluer les séquences de siRNA qui avaient la meilleure activité de silencing sans activer les cellules cibles. Certaines séquences consensus riches en G et en U ont été identifiées comme étant particulièrement immunostimulatrices, GUCCUCAA et UGUGUG. D'autre part, plus le siRNA est long et sous forme de simple brin, plus il est stimulateur, par rapport au siRNA plus court et sous forme de duplexe. Différentes modifications chimiques ont été testées pour diminuer l'activation des cellules

par les siRNA. En effet, les modifications de type LNA (locked nucleic acid) ou des substitutions de type 2'-Fluoro ou 2'-O-méthyl (addition d'un méthyle sur l'adénosine et dans une moindre mesure sur la guanosine) permettent de largement réduire les effets secondaires des siRNA (Fucini *et al.*, 2012; Judge *et al.*, 2005; Sioud *et al.*, 2007). Il a par ailleurs été montré que seulement 5% de modifications (sur 2 nucléotides) sur le seul brin sens du duplexe du siRNA étaient nécessaires pour pratiquement éradiquer l'activité immunostimulatrice (Judge *et al.*, 2006). Plus récemment, Jahns *et al.* ont montré en 2015 que les liaisons phosphorothioates (PS, présence de soufre) entre les nucléotides notamment sur l'extrémité 3' permettent de protéger les siRNA contre le clivage par les exonucléases, par rapport aux liaisons phosphodiester (PO, présence d'oxygène) (Jahns *et al.*, 2015). Cependant, une modification totale des PO en PS engendre une baisse de l'activité des siRNA. Il faut aussi prendre en compte les profils stéréochimiques, et donc les méthodes d'obtention (agents chimiques activateurs) des siRNA. Une autre stratégie pour augmenter l'efficacité thérapeutique du siRNA consiste à rajouter des petites molécules ou peptides au brin sens du siRNA, comme l'ajout de peptide perméable aux membranes ou de PEG (polyéthylène glycol). La longueur du PEG peut avoir une influence significative sur la stabilité et les propriétés protectrices, ainsi la longueur du PEG dépend de chaque méthode de délivrance (Oishi *et al.*, 2005). Les siRNA modifiés avec des molécules de cholestérol se fixent à l'albumine du sérum ce qui résulte en l'augmentation de sa biodistribution vers certaines cibles comme vers le foie. Plusieurs études ont ainsi tenté d'améliorer les lipides ajoutés au siRNA.

En conclusion, il n'y a pas de séquence de siRNA idéale, mais certaines règles ont été mises en place afin de favoriser l'activité spécifique des siRNA par rapport à leur rôle immunostimulateur. Tout d'abord, il est préférable d'éviter les séquences riches en G et en U et notamment les séquences consensus. D'autre part, des modifications sur les séquences comme l'addition d'un 2'-O-méthyl sur une adénosine peut faciliter la spécificité du siRNA et éviter les effets « off-target ». Par la suite, la modification du squelette PO en PS peut avoir un impact sur l'équilibre activateur du siRNA. Finalement, le type cellulaire cible du siRNA doit être absolument pris en compte pour optimiser le mode de délivrance du siRNA et diminuer les effets secondaires de ce dernier.

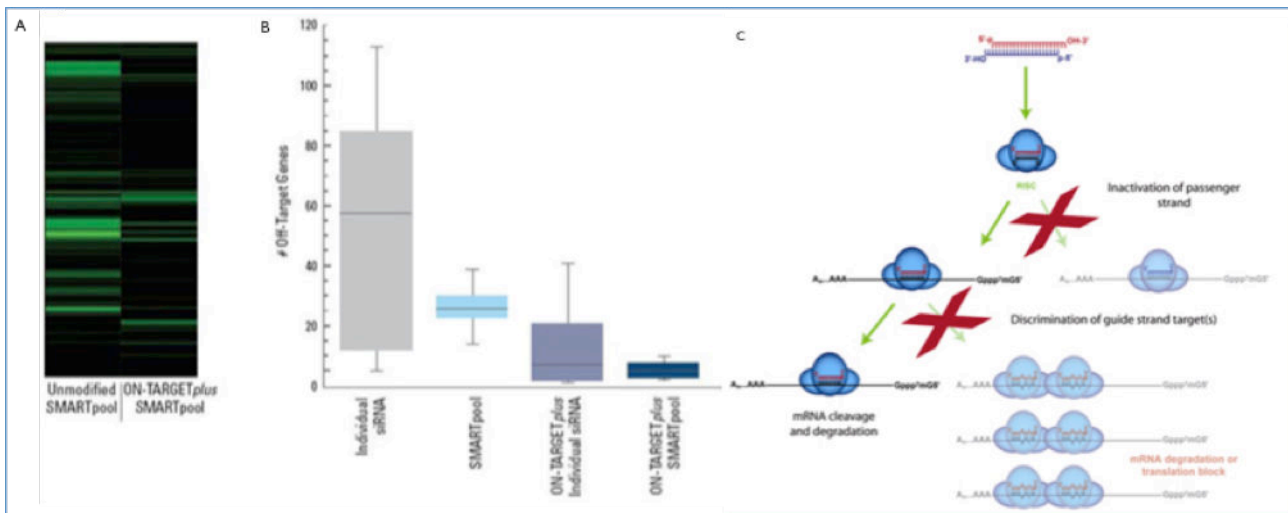
## **V. B. RÉSULTATS OBTENUS**

La technique normalement la plus utilisée pour inhiber la production d'une protéine dans des cellules difficiles à transfecter est la transfection par lentivecteurs. Les lentivecteurs sont des lentivirus dont l'enveloppe a été modifiée, généralement en VSVg, ils possèdent la mixture

de « packaging » qui contient la réverse transcriptase et l'intégrase ainsi que les protéines de la capsid du VIH et bien évidemment l'ARNm de la protéine à exprimer ou le shRNA afin d'inhiber stablement la protéine d'intérêt. Cette technique nécessite des cellules qui sont facilement infectables (au delà de 80%) et qui peuvent être maintenues en culture plusieurs jours (l'expression ou l'inhibition des protéines prend entre 48 et 72h). Cependant, les pDC sont des cellules très peu infectables et qui ne peuvent être maintenues en culture plus de 48h. Nous avons tout de même tenté de les transfecter avec un lentivecteur GFP et d'évaluer leur taux d'infection par cytométrie en flux. Le taux de cellules transfectées après 48 et 72h était identique et de l'ordre de 13% (Figure 1 de l'article n°2) ; nous avons aussi pu observer que les cellules ne se portaient pas très bien dans le cas du 72h. Ceci représente un véritable obstacle ; en effet, après 48h de transfection, les cellules doivent être mises en culture avec des virus (VIH, Flu...) sur la nuit avant de pouvoir étudier leur activation. Ainsi, cette technique ne peut être utilisée avec les pDC.

Dans notre étude, nous avons alors utilisé des siRNA de chez Dharmacon. En effet, des tests préliminaires avec des siRNA d'autres compagnies montraient que les siRNA n'étaient pas du tout fonctionnels. Nous ne pouvons pas dire pour quelles raisons les siRNA n'avaient pas d'activités mais nous pouvons émettre les hypothèses suivantes : les siRNA ne sont probablement pas protégés ni modifiés, ils peuvent ainsi être dégradés et ne pas arriver à leur cible ou avoir des effets « off-target ». Dharmacon utilise la technologie SMARTpool ; les siRNA sont sous forme d'un mix de 4 siRNA individuels qui cible le même ARNm à différents endroits sur la séquence, ce qui permet d'augmenter la spécificité et l'efficacité. Les siRNA sont sous forme d'un double brin d'ARN, ainsi chaque brin va subir des modifications afin d'améliorer son activité : le brin sens va être modifié afin de prévenir l'interaction avec RISC et de favoriser la formation du complexe RISC avec le brin anti-sens ; et l'extrémité 5' du brin anti-sens contient une région d'ancrage « seed region » de 2-8 bases riches en A et U, subit des modifications pour limiter l'activité « off-target » et augmente la spécificité de la cible (Jackson *et al.*, 2006).

Les séquences cibles des siRNA sont les suivantes : pour le siRNA IRF7 (GCACAAGGUGUACGCGCUC – CAACUCCGCGUGCGCACUG – GCGCGCAUCUUCAAGGCCU – CAGGCACGGACCAGACUGA), pour le siRNA TLR7 (CAACAACCGGCUUGAUUUA – GGAAAUUGCCCUCGUUGUU – (GAAUCUAUCACAAGCAUUU – GGAAUUACUCAUAUGCUAA) et pour le siRNA CXCR4 (GAAGCAUGACGGACAAGUA – GGCCUUAUCCUGCCUGGUA – UAACUACACCGAGGAAAUG – CAAGCAAGGGUGUGAGUUU). Cependant les modifications apportées à chaque siRNA ne nous ont pas été transmises par la compagnie, pour cause de confidentialité.



**Figure D22 : Intérêt de la technologie ON-TARGETplus.** Les panels A et B sont des exemples des effets « off-target » obtenus avec ou sans la technologie ON-TARGETplus. (A) Les bandes vertes représentent les gènes qui ont été réduit de plus de 2 fois avec les modifications ON-TARGETplus. (B) L'induction des effets « off-target » de 10 gènes avec les différentes modifications. (C) Représentation de la double modification : les modifications sur le brin sens permettent de favoriser la fixation du brin anti-sens au complexe RISC et les modifications du brin anti-sens permettent d'augmenter la spécificité. Modifié à partir de <http://dharmacon.gelifsciences.com>

Il a été montré que les modes de délivrance des siRNA avaient un rôle primordial sur l'activation des cellules cibles. En effet, les siRNA nus, c'est-à-dire non complexés à des lipides pour moduler leur entrée, ne présentent pas d'activité immunostimulatrice, probablement car ils sont dégradés avant d'être reconnus. D'autre part, les siRNA complexés avec des lipides ressemblent à des particules virales et vont être intégrés dans les cellules (ici les pDC) par la voie de l'endocytose, avant de s'y échapper pour rejoindre le cytoplasme. Il a été montré par Sioud *et al.*, et Hornung *et al.*, que l'électroporation permettait d'éviter l'activation des cellules (Hornung *et al.*, 2005 ; Sioud *et al.*, 2007). Cependant, cette méthode n'est pas envisageable avec des cellules fragiles comme les pDC primaires. En effet, nous avons pu montrer que l'utilisation de cette technique avec le Nucleofector AMAXA provoquait la mort d'un très grand nombre de cellules, même lorsque nous utilisons le kit pour les cellules dendritiques humaines primaires. Nous avons également observé que les cellules restantes sont en partie mortes mais que surtout elles n'intègrent pas le siRNA ajouté. Les pDC sont aussi beaucoup plus activées par rapport aux autres modes de transfection. On peut cependant noter que le peu de cellules qui sont vivantes voit leur protéine cible diminuée. Forsbach *et al.* ont étudié les méthodes de délivrance des siRNA dans des PBMC (Forsbach *et al.*, 2012). Or, nous avons montré que les pDC réagissaient différemment que les autres PBMC en présence des siRNA. En effet, Forsbach *et al.*, ont montré une absence de toxicité pour l'Hiperfect seul et une forte activation des siRNA délivrés par DOTAP. D'autres protocoles ont été mis en place avec succès notamment sur les macrophages, mDC et les

monocytes (Troegeler *et al.*, 2014). Quelques équipes ont réussi avec succès à transférer des siRNA dans des pDC (Beignon *et al.*, 2005; Lepelletier *et al.*, 2010). Nous avons alors tenté d'optimiser leur étude en diminuant le nombre de cellules par puits (ce qui est un facteur limitant lors des études sur les pDC) tout en conservant une excellente viabilité et une bonne transfection. Dans nos expériences, nous avons pu démontrer que les pDC étaient sensibles à la toxicité de l'Hiperfect mais aussi lorsqu'il est complexé et que le seul moyen d'effectuer une interférence efficace était d'utiliser le DOTAP. Le DOTAP est un agent de transfection lipidique de formule N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride), qui forme deux bras capables d'envelopper le siRNA négatif pour lui faire passer les membranes. Le complexe DOTAP-siRNA forme des particules de taille constante d'environ 563nm et a une surface chargée positivement. Nous avons aussi testé l'agent de transfection JetPrime qui est un dérivé de polymère qui va former des complexes chargés positivement avec le siRNA et va rentrer dans la cellule par endocytose. Le complexe va alors se comporter comme une « éponge à protons » en absorbant l'acidité de l'endosome. Ceci va engendrer le grossissement de ce dernier jusqu'à sa rupture et le relargage des particules dans le cytoplasme. Le JetPrime n'induit pas une mort significative avec ou sans siRNA, le taux de transfection observé en FACS est élevé. Cependant, en microscopie nous avons observé un grand nombre de complexes de siRNA de grosses tailles en dehors des cellules, ce qui indique que le complexe n'est jamais parvenu dans le cytoplasme de notre cellule.

Lorsque nous compilons tous les résultats (mortalité, activation, pourcentage de transfection, inhibition de la cible, etc.) que nous avons obtenus avec les différentes méthodes de transfection, nous pouvons dire que le DOTAP est l'agent de transfection le plus adapté à notre modèle de pDC primaires humaines. D'autre part, pour valider ces résultats nous avons ciblé deux protéines spécifiques des pDC, TLR7 et IRF7, impliquées dans la voie d'activation des pDC. Nous avons pu montrer que notre technique de siRNA diminuait l'expression des protéines cibles et n'induisait pas l'activation des pDC. D'autre part, nous avons aussi montré que sur une protéine aussi abondante que CXCR4, nous arrivions à diminuer son expression et sa fonction biologique dans les pDC. D'autre part, nous avons aussi montré que les cellules répondaient toujours aux stimulations virales après avoir été transfectée avec un siRNA, ce qui nous permet d'affirmer que le siRNA n'affecte pas le fonctionnement général de la cellule mais cible spécifiquement la protéine d'intérêt.

Ainsi ces résultats vont permettre d'étudier spécifiquement des protéines des pDC primaires humaines sans utiliser des molécules exogènes ou d'affirmer des résultats par corrélation.

## V. C. RECHERCHE POTENTIELLE EN THÉRAPEUTIQUE

Quand la séquence du siRNA est définie de façon appropriée, la machinerie de l'ARN interférence peut être exploitée pour inhiber l'expression de presque tous les gènes dans le corps, en raison de son potentiel thérapeutique plus large que les autres petites molécules. En effet, il a déjà été montré que les siRNA synthétiques sont capables d'inhiber des cibles dans de nombreuses pathologies, comme l'hypercholestérolémie, les cirrhoses du foie, les infections avec le virus de l'hépatite B ou du papillomavirus et les cancers des ovaires et des os.

Alors que des siRNA chimiquement modifiés « nus » peuvent être efficaces dans certains organes comme le cerveau et les poumons, la plupart des tissus du corps ont besoin d'un système de délivrance supplémentaire pour faciliter la transfection. La raison de cette observation vient du fait que le siRNA « nus » son sujets à la dégradation par les enzymes endogènes et sont trop gros (~13 kDa) et chargés trop négativement pour traverser la membrane cellulaire. La « delivery » localisée du siRNA – c'est à dire l'application de la thérapie par le siRNA directement sur les tissus cibles – offrent plusieurs bénéfices, notamment la possibilité d'une biodisponibilité plus importante mais aussi permet une diminution des effets secondaires associés à une administration systémique. Plusieurs maladies sont propices pour les thérapies locales comme les muqueuses, les tumeurs locales mais aussi les maladies et infections des poumons dans lesquelles le siRNA peut être délivré par spray intranasal. La plupart des tissus ne peuvent être ciblés qu'en passant par le sang périphérique ce qui engendre un grand nombre de complications pour la stabilité et la biodisponibilité du siRNA ; il faut en effet tenir compte de la filtration des reins, la phagocytose, l'agrégation avec des protéines du sérum et la dégradation enzymatique. Le siRNA doit aussi se déplacer dans la matrice extracellulaire qui peut ralentir son déplacement. Finalement, une fois dans la cellule cible, la particule de siRNA doit échapper à l'endosome afin d'atteindre le cytoplasme. Si le siRNA reste dans l'endosome, il va être déplacé dans des lysosomes à pH acide et être dégradé.

De nos jours, il existe de plus en plus d'études sur les thérapies à base de siRNA. La plupart des essais cliniques reposent sur les différentes formes de délivrance localisée.

Notre étude a permis d'identifier une technique efficace qui permet de transfecter les pDC tout en conservant leur fonctionnalité. Comme nous l'avons déjà détaillé à plusieurs reprises, il est indispensable de moduler l'activation des pDC dans les diverses pathologies dans lesquelles l'hyperactivation de ces cellules est néfaste. Nous avons ici développé une méthode qui pourra être potentiellement utilisée en thérapeutique dans des traitements locaux d'infection ou d'hyper-inflammation en ciblant des protéines spécifiques dans les pDC.



## VI. LES CELLULES GÉANTES MULTINUCLÉES SONT-ELLES INFECTÉES ?

Nous avons pu montrer que des pDC purifiées et cultivées en présence de VIH (AT-2) X4 étaient capables de former les cellules géantes multinuclées (MGC) *in vitro*. Il est maintenant admis que les pDC ne sont que très faiblement infectées ; pour autant, il semble que ces MGC soient capables de concentrer le virus. Ainsi, nous pouvons spéculer que la fraction de MGC représente les pDC infectées.

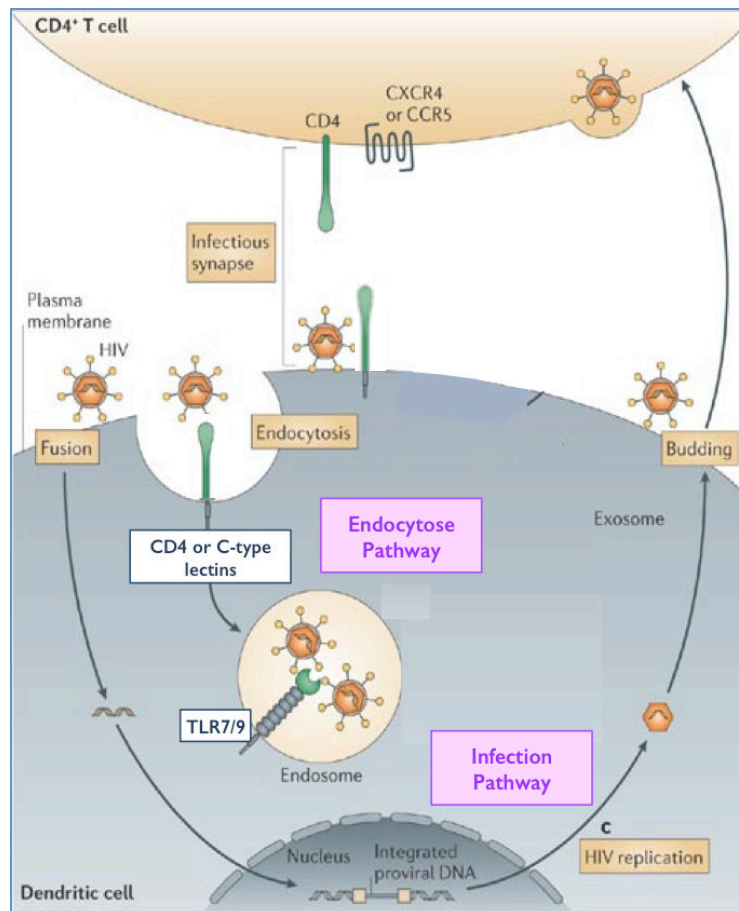
Lors de l'expérience pour quantifier le taux d'infection des pDC avec les lentivecteurs GFP (Figure 1 de l'article n°2), nous avons pu observer simplement avec un microscope classique, la formation d'un plus grand nombre de cellules géantes qui apparaissaient être des MGC. Les lentivecteurs GFP possèdent une enveloppe VSVg, ainsi les virions n'ont pas besoin de se fixer à un récepteur spécifique du VIH pour rentrer dans la cellule mais aux glycoprotéines de la cellule afin de fusionner avec cette dernière et libérer son matériel génétique dans le cytoplasme. Les lentivecteurs ont la capacité d'intégrer le génome des pDC (à la hauteur de 13%) mais ne sont pas réplicatifs. D'autre part, les pDC sont aussi capables d'endocyter les lentivecteurs. A l'inverse, le virus du VIH de tropisme X4 que l'on utilise habituellement, est traité à AT-2. Ainsi, il peut lui aussi être endocyté par les pDC mais il peut aussi, dans quelques rares cas (infection estimée à moins de 5%), fusionner avec la membrane de la cellule cible en se fixant à ses récepteur et corécepteur (CD4 et CXCR4). D'autre part, l'AT-2 empêche à l'ARN viral d'être rétrotranscrit et donc à l'ADN viral d'intégrer le génome de l'hôte. Avec les deux types de virus, nous avons pu observer des MGC. Ainsi, les premières étapes de l'infection, c'est à dire la fusion du virus avec la cellule pourrait se révéler suffisante à la formation de MGC.

Afin de vérifier ces données, différentes expériences peuvent être mises en place :

- l'utilisation de ligand synthétique des pDC comme l'imiquimod, qui utilise exclusivement la voie de l'endocytose, permettrait de valider que la fusion des virus avec la cellule est nécessaire à la formation de MGC ;
- une expérience de microscopie avec le lentivecteur GFP permettrait de valider que les MGC sont bien les cellules infectées ;
- l'utilisation d'AMD3100 qui permet de bloquer la fusion d'un virus VIH de tropisme X4 et donc l'infection mais n'empêche pas l'activation des pDC.

La plupart des MGC sont associées à la formation de syncytia. Les syncytia ont largement été caractérisés dans la pathologie du VIH et notamment dans le diagnostic d'encéphalites associées au VIH (aussi appelées neuro-SIDA), une condition neuro-dégénérative qui mène à la démence. Ces syncytia sont relativement rares dans les tissus lymphoïdes des patients infectés

mais toujours présents. Les cellules infectées par le VIH vont présenter à leur membrane le complexe viral Env gp120/gp41 et vont pouvoir interagir avec des cellules non-infectées qui expriment le récepteur de Env, CD4 et le corécepteur CXCR4 ou CCR5. Ce mécanisme implique des évènements tels qu'une fusion de cellule à cellule qui induit ainsi la formation de syncytia. L'utilisation d'un lentivecteur avec un Env VSVg ne permet pas à la cellule d'exprimer de nouveaux récepteurs viraux à sa surface, et donc de fusionner avec des cellules infectées. La formation de MGC dans notre étude ne correspond donc pas à la formation de syncytia.



**Figure 23 : Les voies de l'endocytose ou de l'infection par le VIH dans les pDC.**

*Modifié à partir de (Wu and KewalRamani, 2006)*

### III. QUESTIONS OUVERTES

#### VII. A. QUEL RÔLE POUR LA SPERMINE DANS LE SPERME ?

Le fluide séminal, en délivrant les spermatozoïdes aux ovocytes, délivre aussi des molécules qui interagissent avec les cellules épithéliales de l'organisme femelle qui induisent notamment l'expression génétique, le recrutement des leucocytes et l'activation innée et adaptative du système immunitaire ainsi que la réponse inflammatoire. Cette induction de l'immunité facilite la préparation des tissus reproductifs de la femelle à une potentielle grossesse en se débarrassant des débris et des pathogènes, en effectuant une sélection du sperme et en induisant une tolérance envers l'embryon semi-allogénique. En effet, il y a un recrutement local de macrophages, de cellules dendritiques, dont des pDC et des granulocytes. Lors de la cross-présentation par les DC de la femelle, les antigènes dans le fluide séminal activent et augmentent l'induction des lymphocytes T régulateurs. Ainsi il a été montré que le fluide séminal avait un rôle majeur dans les réponses immunitaires et qu'il était important dans la fertilité et dans la transmission de pathogènes comme le VIH (Munch *et al.*, 2007; Munch *et al.*, 2013). D'autre part, il a été montré qu'il y avait une induction de certaines cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-8 mais aussi d'un grand nombre de chimiokines comme CXCL1, CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ), CXCL2 (MIP-2 $\alpha$ ) et CXCL3 (MIP-2 $\beta$ ) (Sharkey *et al.*, 2007). Cependant, aucune étude ne se focalise sur les IFN de type I induit par le liquide séminal ; seule une étude montre que lors d'une infection virale ou bactérienne l'IFN $\epsilon$  peut être produit dans l'endomètre (Fung *et al.*, 2013). Cette absence de résultat tend à montrer qu'il y a probablement très peu de réponses IFN-I engendrées en réponse au liquide séminal.

La spermine et la spermidine ont tout d'abord été identifiés dans le sperme en tant que capteur de radicaux libres protonés afin de protéger des spermatozoïdes des ROS. Il a aussi été montré qu'elles sont présentes en très grandes quantités ; il est considéré que la spermine est présente à des concentrations comprises entre 2 et 15mM et la spermidine entre 0,3 et 10mM (Bamberg *et al.*, 1975; Gugliucci and Menini, 2003) Or, nous avons montré que ces polyamines peuvent aussi inhiber la réponse immunitaire des pDC et des monocytes. Nous pouvons alors supposer que la présence en grande quantité de spermine et spermidine dans le liquide séminal inhibe la réponse immunitaire de la femelle, ce qui expliquerait qu'il n'y ait pas d'IFN-I produit. Ce mécanisme permet en effet d'éviter une trop forte réponse immunitaire qui pourrait détruire les spermatozoïdes et empêcher la fécondation de l'ovule.

## VII. B. POURQUOI LA PRÉSENCE ET LE RÔLE DES pDC DANS L'ORGANISME SONT-ILS REMIS EN QUESTION ?

Comme nous l'avons largement détaillé précédemment, les pDC sont des cellules de l'immunité innée, professionnelles de la production d'IFN-I, après stimulation virale des TLR. La fonction des TLR dépend fortement du type cellulaire dans lequel il est exprimé, car en effet les niveaux d'expression des protéines adaptatrices impliquée dans la voie de signalisation sont eux aussi différents selon les types cellulaires.

Le rôle des pDC est de plus en plus remis en question (Alexandre *et al.*, 2014; Crozat *et al.*, 2009). En effet, en raison de l'effet néfaste des larges quantités d'IFN-I, il a été suggéré que les pDC n'avaient plus leur rôle dans l'organisme moderne. En effet, plusieurs hypothèses ont été émises quant à leur rôle, suggéré inutile.

- Tout d'abord, les pDC n'étant pas la seule source d'IFN-I lors d'infection virale, il a été suggéré que les pDC étaient responsables de la production systémique et non locale d'IFN (Dalod *et al.*, 2002; Zucchini *et al.*, 2008). En effet, d'autres types cellulaires induisent localement la première réponse IFN (Kumagai *et al.*, 2007). Nous pouvons contester cette hypothèse puisque la production d'IFN des pDC est très différente de celle des autres types cellulaires car elles peuvent produire de grandes quantités de tous les sous-types d'IFN-I très rapidement après leur mise en contact avec des virus libres ou des cellules infectées, sans être elles-mêmes infectées. Cette propriété résulte en partie du fait que les pDC expriment sélectivement TLR7 et TLR9 couplés à IRF7. Ainsi, l'activation des pDC a été considérée comme la première ligne de défense contre les virus en induisant un rapide et large état antiviral dans l'organisme avec la production d'IFN-I. La production d'IFN par d'autres cellules immunitaires ou par des cellules infectées serait donc un événement alternatif local en cas d'échec de la production d'IFN systémique.

- Plusieurs études ont montré que la déplétion des pDC dans des modèles murins pouvait avoir plus ou moins de conséquences en fonction du type d'infection virale. En général, la production d'IFN-I n'est pas affectée et les auteurs n'observent donc pas de progression drastique des maladies. Cependant, ils préviennent aussi que les anticorps anti-pDC ne sont peut être pas suffisamment efficaces ou spécifiques (Crozat *et al.*, 2006; Presti *et al.*, 1998). D'autre part, nous pouvons noter que la fonctionnalité des pDC, mais aussi du système immunitaire en général, est très propre à chaque espèce. Certains phénomènes expliqués dans la souris ne peuvent cependant pas expliquer la physiologie humaine.

- D'autres études, sur des patients, ont montré que des mutations responsables de la perte totale de la production d'IFN-I en réponse à une stimulation TLR (mutations dans IRAK-4 et MyD88 par exemple) n'était pas autant létale que l'aurait pu l'être une mutation dans STAT1 ou

dans IRF7 (Ciancanelli *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2005). Ces résultats suggéreraient que les pDC ne sont pas la première ligne de défense contre la plupart des infections virales ou que du moins elles sont largement redondantes avec d'autres types cellulaires qui auraient les mêmes fonctions. Ainsi, les pDC représenteraient la deuxième ligne de défense contre les infections virales en induisant de larges quantités d'IFN-I systémique afin de remplacer une réponse locale qui aurait échoué. A cela, nous pouvons répondre que les réponses immunitaires innées sont des réponses qui doivent être extrêmement complexes afin d'assurer, quelques soient les conditions, la protection de l'organisme. Ainsi, les pDC, en tant que meilleure productrice d'IFN-I sont nécessaires à une réponse antivirale efficace. En effet, elles ne sont peut être pas complètement indispensables à la réponse IFN-I, ce qui est rassurant ; en effet, l'organisme a su mettre en place d'autres systèmes de sécurité en cas de défaillance des pDC ou de la production d'IFN-I, comme la présence d'autres types d'IFN (II et III). Nous pouvons aussi considérer que les soins médicaux et les modes de vie actuels de l'homme affectent l'équilibre entre la réponse immunitaire et la maladie lors d'une infection virale. Les conditions sanitaires améliorées, les antibiotiques et les immunisations contribuent considérablement à protéger les individus des infections ou en tout cas diminuer la sévérité de la maladie. Les mutations précédemment citées, qui augmenteraient la sévérité de la maladie mais sans danger de mort chez l'homme dans la société moderne, seraient expliquées par les progrès de la médecine et non par « l'inutilité » de la réponse des pDC. Ceci ne démontre donc pas que les pDC et l'IFN-I n'ont pas leur place dans le corps humain mais que les conditions sanitaires actuelles permettent de survivre avec de telles déficiences.

Ainsi il faut garder un œil critique sur toutes ces études qui tendent à montrer le rôle inutile d'un certain type cellulaire. Les pDC sont probablement apparues dans l'évolution afin de contrer les mécanismes échappatoires des virus qui bloquent les voies de signalisation de l'IFN. Il serait alors intéressant d'étudier les TLR7/9 dans l'évolution par rapport aux autres RLR et à quel moment les pDC sont apparues par rapport à la diversification des gènes de l'IFN-I pour enfin comprendre entièrement le rôle exact de ces cellules si complexes.

## **VII. C. L'ÉVOLUTION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE**

Les TLR possèdent un champ large de ligands variés, contrairement à la spécificité étroite des récepteurs antigéniques de l'immunité adaptative. Il existe ainsi 12 membres de la famille des TLR chez la souris et 10 chez l'homme. Ils partagent une structure commune composée d'un domaine extracellulaire LRR qui est le domaine de fixation et un domaine cytoplasmique Toll et TIR afin d'induire le signal intracellulaire. Les ligands microbiens qui peuvent s'y fixer sont

caractérisés par (1) l'absence de leur expression dans l'hôte et (2) un nombre limité des microorganismes de la classe à laquelle ils appartiennent. D'autre part, alors que les RLR sont exprimés de façon ubiquitaire dans toutes les cellules, les TLR et les NLR sont le plus souvent trouvés dans les cellules immunitaires et les cellules épithéliales ou endothéliales.

Des études sur la souris ont permis de mettre en évidence la redondance et la hiérarchie entre les senseurs des divers pathogènes. Ainsi, il a été montré que l'adaptateur MyD88 est absolument nécessaire à la voie de signalisation de TLR. Par exemple, des pDC de souris MyD88<sup>-/-</sup> ne produisent plus d'IFN-I et d'IL-12 en réponse à l'infection par MCMV, un virus à ADN. Cependant, les souris TLR9<sup>-/-</sup> sécrète moins, mais suffisamment, d'IFN-I pour protéger contre le MCMV. Comme attendu dans ce cas, les souris TLR7<sup>-/-</sup> produisent des niveaux normaux de IFN-I. Cependant, les pDC TLR7<sup>-/-</sup> et TLR9<sup>-/-</sup> ne produisent plus du tout de d'IFN-I de la même façon que les souris MyD88<sup>-/-</sup>. Cette expérience montre que TLR7 peut partiellement remplacer TLR9 pour la détection de MCMV sans que TLR7 et TLR9 ne soient complètement redondants. De la même façon, des patients avec des déficiences dans MyD88 ou IRK4 montrent de grandes susceptibilités à des bactéries pyogéniques mais ne semblent pas être affectés par les virus ou d'autres microorganismes. La régulation positive des pDC contribue à leur capacité à induire de hauts niveaux d'IFN-I rapidement après l'infection virale. De plus, des effets synergiques entre les senseurs de l'immunité innée de la même famille, dans le même type cellulaire, ont été observés comme entre TLR7, TLR8 et TLR9.

Les TLR sont une famille multigénique qui a été conservée chez les vertébrés et chez les non-vertébrés. Un arbre phylogénique a identifié 6 grandes familles de TLR qui contenaient presque tous les TLR des vertébrés et qui a pu montrer qu'ils évoluaient à la même vitesse et de façon très lente (Roach et al., 2005). Il n'y a donc aucun hasard dans l'évolution des TLR, ce qui en fait une exception dans l'évolution des membres de familles multigéniques et montrent l'importance de la conservation de ces protéines. Grâce à la robustesse de l'évolution des TLR, l'horloge biologique a pu être utilisée pour étudier certains aspects de l'évolution des TLR. Il a ainsi été évalué que la divergence des familles majeures de TLR date de deux fois plus tard que la divergence entre les poissons et les tétrapodes, ce qui correspond à avant la période Cambrien (- 490 millions d'années). Dans les études d'évolution des TLR chez les vertébrés, il a été montré que TLR7 et TLR8 sont toujours présents en tandem, ce qui montre l'importance de ces TLR dans les différents organismes.

Dans la famille des poissons, les cartilagineux (*Chondrichthyes*) sont les plus vieux vertébrés possédant une mâchoire. Les *Elasmobranchii* sont connus pour avoir divergés de l'ancêtre commun il y a 460-520 millions d'années. Parmi eux, les différentes espèces de requin possèdent un système immunitaire complexe, qui n'est pas encore complètement caractérisé. Cependant,

plusieurs preuves tendent à prouver qu'ils possèdent une immunité innée et adaptative, comme la phagocytose, la cytotoxicité non-spécifique et le chimiotaxisme. Cependant, il a fallu attendre 2012 pour que la première preuve d'un TLR chez le requin soit montrée (Anandhakumar *et al.*, 2012). En effet, les auteurs ont trouvé de l'ARNm de TLR2-TIR dans différents tissus comme les reins, la rate mais aussi la peau et les ailerons et de façon plus surprenante, dans le cerveau. De plus, les niveaux de TLR2-TIR sont augmentés en réponse à des peptidoglycanes. Une étude transcriptomique complète de la rate et du rein du requin gris *Chiloscyllium griseum* a été réalisée en 2014 et a démontré la présence possible de différents TLR (TLR2, TLR3, TLR6 et TLR9), RLR (RIG-I et MDA5), NLR (NOD1 et NOD2) et la majorité des médiateurs de la voie de signalisation en aval (on peut citer notamment TRAF3, TBK1, IRF3 et IRF7). La présence d'ARNm de TLR3, TLR9 et IL-8 a été validée par RT-qPCR (Krishnaswamy Gopalan *et al.*, 2014). D'autre part, TICAM-1 et TICAM-2 (avec cependant des mutations) ont été trouvés chez le requin, alors que le récepteur correspondant, TLR4, semble absent ; TICAM-2 semble nécessaire à la voie de signalisation complète de TLR4. D'autre part, l'absence de cancer chez les requins est associée à la présence importante de cartilage, qui est un tissu avasculaire et qui contient une activité 100 000 fois plus inhibitrice d'angiogenèse que tous les autres types de tissus (Criscitiello, 2014). Ainsi, les requins sont résistants à de grandes quantités de toxines cancérigènes. La majorité des infections chez les requins sont causées par des bactéries ou des parasites. En effet, seuls deux virus ont été décrits chez les différentes espèces de requin et le génome du requin ne possède aucune séquence rétrovirale. Cette absence d'infection virale a été expliquée par la présence de la squalamine, un agent antimicrobien, qui lorsqu'il rentre dans la cellule peut déplacer des protéines qui sont associées à travers des interactions électrostatiques avec la face interne cytoplasmique de la membrane (Zasloff *et al.*, 2011). Cette molécule chargée très positivement neutralise les charges négatives des surfaces sur lesquelles elle se fixe, ce qui va provoquer le déplacement des protéines ancrées à la membrane et empêcher l'entrée mais aussi toutes les autres étapes du cycle de réplication du virus à enveloppe à ARN ou à ADN.

On peut noter qu'il n'y a pas d'étude sur les IFN au-delà des poissons et les pDC ont été identifiées que chez les mammifères, probablement faute d'étude sur d'autres espèces. Le requin possède donc un système immunitaire quasi parfait (pas de cancer, peu d'infection virale), il semble donc indispensable de l'étudier et d'arrêter le massacre de cette espèce qui a survécu depuis 400 millions d'années sur notre planète.

# **ANNEXES**





# **INTRODUCTION : TRAIL/APO2L, UN LIGAND PRO-APOPTOTIQUE**

## **I. L'APOPTOSE : LA MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE**

Le concept de la mort cellulaire naturelle remonte à 1842 quand Karl Vogt a montré que la queue du têtard est enlevée par mort cellulaire pendant leur métamorphose, facilitant ainsi la formation des vertébrés (Vogt, 1842). Cependant, pendant des années, la mort cellulaire était seulement considérée comme un passage final inévitable et passif de la vie. Cette notion a été remise en cause dans les années 1960 par l'observation que le développement dû à la mort cellulaire dépendait de l'expression de gènes endogènes, amenant ainsi à la notion de mort cellulaire programmée (PCD = programmed cell death) (Lockshin, 1964). Une autre contribution à cette notion est venue des études par microscopie électronique effectuées par Kerr, Wyllie et Currie à la fin des années 1970, qui ont permis de déterminer des marqueurs spécifiques des différentes morts cellulaires. Les cellules qui meurent pendant un développement normal et l'homéostasie tissulaire présentent des marqueurs morphologiques, comme le rétrécissement, la condensation nucléaire et la rétention de l'intégrité de la membrane et des organelles ; on parle d'apoptose (Kerr *et al.*, 1972). Il a par la suite été montré que l'apoptose n'était pas le seul type de mort des PCD. A l'inverse, les cellules qui gonflent et éclatent suite à un trauma puissant meurent par nécrose.

Il a été montré chez le zebrafish que la voie de signalisation de TRAIL n'était pas indispensable pour le bon développement embryonnaire (Eimon *et al.*, 2006). De la même façon, il a été montré que chez les souris KO pour mDR5 (Death Receptor), le récepteur de mort de TRAIL ou pour TRAIL ne présentaient pas d'altération dans leur survie ou dans leur développement, même si elles sont plus susceptibles aux sarcomes cancérigènes et aux métastases (Diehl *et al.*, 2004). On peut remarquer que les souris ne possèdent qu'un seul DR – mDR5 – qui présente une forte homologie avec le DR4 et DR5 humain (Wu *et al.*, 1999). Ces résultats signifient que, même si l'apoptose est essentielle au développement, la signalisation de TRAIL/DR n'est pas indispensable au développement embryonnaire du zebrafish et de la souris (Cretney *et al.*, 2002). Cependant aucune étude n'a été menée chez l'homme afin de valider ces résultats. Nous pouvons cependant affirmer que TRAIL est exprimé très précocement, lors des premiers stades de l'embryogénèse.

L'apoptose est le mécanisme majeur de la mort cellulaire programmée utilisée par les organismes métazoaires pour éliminer les cellules superflues et comportant des dommages irréparables (détaillée dans la revue très complète de (Fuchs and Steller, 2015)). Elle a un rôle crucial dans la formation des organes pendant le développement et contrôle l'homéostasie et l'intégrité des tissus pendant leur durée de vie. L'apoptose peut être engendrée par une large

variété de stimuli, incluant les signaux du développement, les stressés cellulaires sévères ou des dommages aux composants cellulaires essentiels, dus aux chocs thermiques, aux radiations, à la toxicité de drug, aux infections et aux transformations oncogéniques (Meier *et al.*, 2000).

La régulation aberrante des mécanismes d'apoptose cellulaire est un important facteur pathologique dans un grand nombre de maladies (Fadeel *et al.*, 1999). En effet, une déficience en apoptose est l'un des marqueurs du cancer, des maladies auto-immunes et des désordres auto-immuns. A l'inverse, un excès d'apoptose a un rôle important dans les désordres neurodégénératif (Alzheimer et Huntington), les accidents vasculaires cérébraux, les maladies cardiaques ischémiques, le SIDA (Syndrome d'immunodéficience acquise) (Casella and Finkel, 1997) et l'infertilité. Dans les cellules de mammifères, l'apoptose se produit selon deux voies de signalisation : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. La voie intrinsèque est activée par des phénomènes intracellulaires et dépend du relargage de facteurs pro-apoptotique par les mitochondries (Danial and Korsmeyer, 2004). La voie extrinsèque reçoit un signal à travers la fixation de ligands extracellulaire protéiques sur des récepteurs de mort pro-apoptotiques présents à la surface des cellules (Ashkenazi and Dixit, 1998). Les deux voies entraînent l'activation hiérarchique de protéases cysteine-aspartate spécifiques appelées caspases (Lavrik *et al.*, 2005).

## **II. LES CASPASES : LES ACTRICES PRINCIPALES DE L'APOPTOSE**

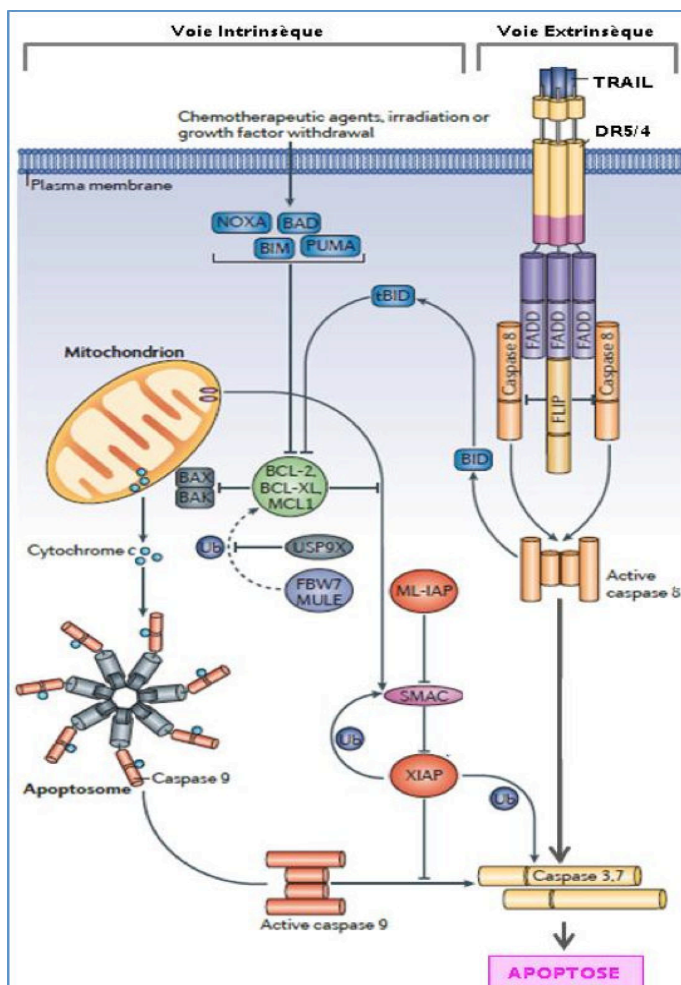
L'apoptose est la PCD la plus connue et la mieux étudiée pendant le développement (Yi and Yuan, 2009). Ce processus conservé, qui peut être activé intrinsèquement et extrinsèquement, aboutit à l'activation des caspases, qui sont une catégorie de protéases à cystéine qui sont exprimées de façon inactive dans toutes les cellules (Thornberry and Lazebnik, 1998). Même si ces caspases ont des rôles primordiaux et indispensables dans l'apoptose, ces protéines ont aussi des fonctions non-apoptotiques dans des processus variés, comme dans l'immunité, le remodelage cellulaire, la mémoire et la différenciation cellulaire. Cependant, une fois activées les caspases peuvent détruire la cellule en clivant un grand nombre de protéines clés. Ainsi, les caspases jouent un rôle essentiel dans les changements morphologiques et biochimiques des cellules apoptotiques. En effet, les altérations caractéristiques d'une cellule en apoptose sont le bourgeonnement de la membrane cellulaire, l'exposition des phosphatidylserines à la surface externe des membranes cellulaires (ce qui permet la fixation de l'Annexine V pour effectuer les marquages de mort précoce en cytométrie en flux), le rétrécissement du cytoplasme, la condensation des chromatines et la fragmentation de l'ADN (Khosravi-Far and Esposti, 2004). La transformation de la morphologie des cellules apoptotiques s'associe à la formation de corps apoptotiques qui sont

reconnus et éliminés par des phagocytes spécialisés et les cellules voisines par phagocytose (Khosravi-Far and Esposti, 2004).

Chez les mammifères, les caspases sont divisées en deux catégories, les caspases initiatrices, qui incluent les caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11 et 12 et les caspases exécutrices, qui incluent les caspases 3, 6, 7 et 14. Les caspases initiatrices ont de longs domaines terminaux qui permettent la formation de plateformes qui régulent leur activation (Yuan and Kroemer, 2010).

Les caspases sont synthétisées dans la cellule comme des zymogènes inactives avec un prodomaine en N-terminal couplé à une large sous-unité p20 et une petite sous-unité p10 qui forme le domaine catalytique. En réponse à un signal d'induction d'apoptose, les caspases initiatrices sont recrutées et forment un complexe oligomérique avec des protéines adaptatrices activées, ce qui a pour conséquence le rapprochement de deux monomères de caspase et ainsi sa dimérisation et donc son activation. Les caspases initiatrices activées vont à leur tour activer les caspases exécutrices, qui sont sous forme de dimère avec de courts prodomaines, par clivage protéolytique du lien qui sépare les deux sous unités catalytiques (Pop and Salvesen, 2009).

### III. LES VOIES DE SIGNALISATION DE L'APOPTOSE



**Figure A1 : Mécanisme intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.** La voie intrinsèque est activée par des agents extérieurs, ce qui mène à l'activation des protéines de la famille du BCL-2. La mitochondrie relargue du cytochrome c et active l'apoptosome, composé de la caspase-9, qui va alors activer la caspase-3 et -7. La voie extrinsèque est induite par la fixation des membres de la famille du TNF à son récepteur de mort ce qui va induire la formation du DISC. DISC active la caspase-8 qui va à son tour activer la caspase-3 et -7. Modifié à partir de (Vucic et al., 2011)

### III. A. LA VOIE INTRINSÈQUE DE L'APOPTOSE

La voie intrinsèque est induite par la mitochondrie et se produit dans les cellules de type II (Schmitz *et al.*, 2000). Elle peut être activée par un panel de stimulant du stress, incluant les radiations UV, les irradiations gamma, la chaleur, des facteurs de virulence virale, le manque de facteurs de croissance, la plupart des agents nuisibles à l'ADN et l'activation de certains facteurs oncogéniques. Ces facteurs de stress sont reconnus par divers composants intracellulaires qui transmettent le signal aux mitochondries, ce qui résulte en la MOMP (Khosravi-Far and Esposti, 2004). La MOMP permet à diverses protéines normalement cantonnées à l'espace intermembranaire mitochondrial (IMS = mitochondrial intermembrane space) de diffuser vers le cytoplasme. Certaines protéines sont capables d'échapper à l'IMS, les facteurs apoptogéniques, qui jouent un rôle vital dans l'apoptose dépendante des mitochondries (Wang, 2001). Dans le cytosol, un facteur apoptogénique, le cytochrome c, se lie à l'Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1) de manière ATP dépendante afin de former un complexe connu sous le nom d'apoptosome qui après recrutement de la pro-caspase 9 va induire l'oligomérisation et l'activation de la caspase 9 (Lakhani *et al.*, 2006). L'activation de la caspase 9 mène à l'activation des caspases exécutrices 3, 6 et 7 afin d'induire l'apoptose de la cellule (Slee *et al.*, 1999).

### III. B. LA VOIE EXTRINSÈQUE DE L'APOPTOSE

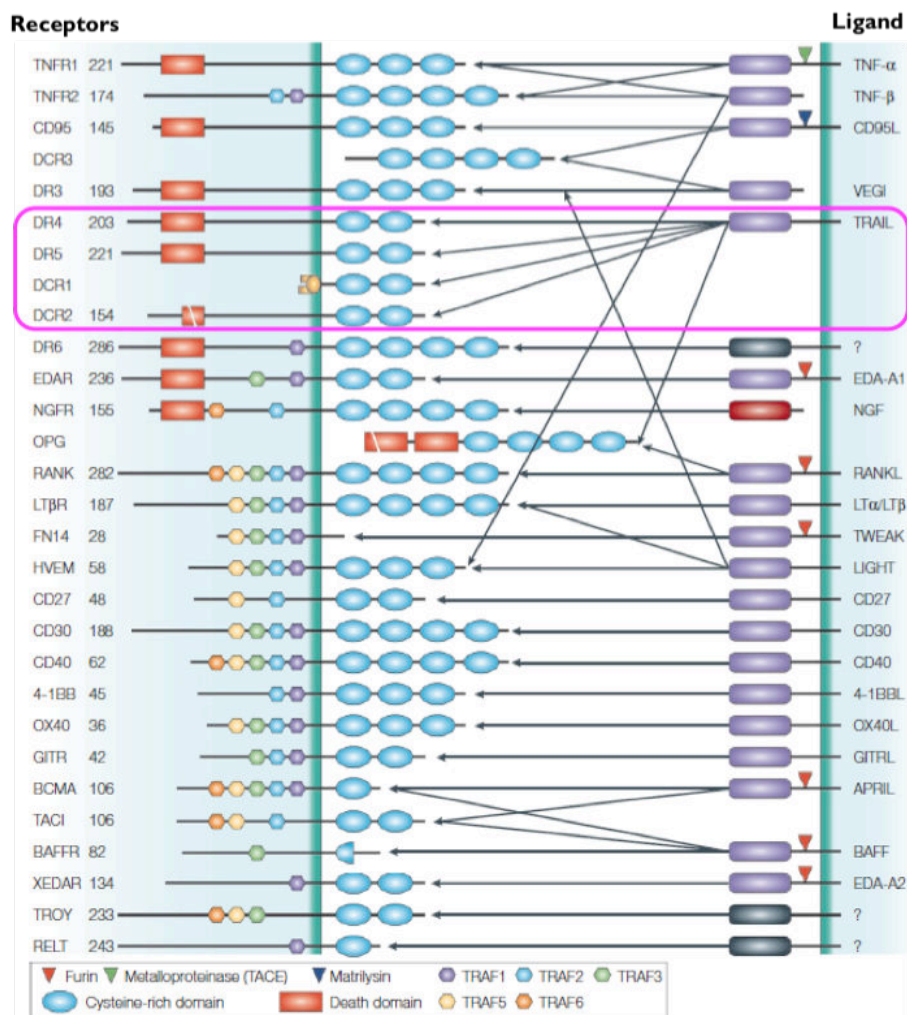
#### III. B. I. Vue d'ensemble de la voie extrinsèque

En fonction du type cellulaire, l'activation de l'apoptose par la voie extrinsèque peut potentiellement dépendre de la voie intrinsèque (Scaffidi *et al.*, 1998). La voie de signalisation extrinsèque est induite par les récepteurs de mort ou par le granzyme présent à la surface des cellules de type I (Schmitz *et al.*, 2000). Les cellules de type I possèdent de hauts niveaux de formation du DISC (death-inducing signaling complex) et des quantités importantes de caspase-8 active, ce qui conduit à l'activation directe des caspases effectrices en aval. Cette voie transmet des signaux à partir de ligands extracellulaires liés à leur récepteur de mort pro-apoptotique (DR) afin d'activer la machinerie des caspases apoptotiques après l'assemblage du DISC (Peter and Krammer, 2003). En fonction des types cellulaires, les voies extrinsèque et intrinsèque peuvent se croiser. Chez les mammifères, la voie extrinsèque a un rôle important dans la régulation de différents aspects de l'immunité. Dans des conditions physiologiques, elle participe à la sélection et au maintien du répertoire immunitaire et régule la réponse immunitaire. De plus, la voie

extrinsèque aide à se débarrasser de cellules infectées, transformées ou endommagées. Les cellules Natural Killer (NK) et les lymphocytes T cytotoxiques expriment les ligands pro-apoptotiques de la superfamille du TNF, qui reconnaissent les DR spécifiques à la surface de leurs cellules cibles.

Dans ces cellules de type II, les niveaux de formation du DISC sont faibles et donc la caspase-8 est moins active. Ainsi l'induction de l'apoptose nécessite des signaux supplémentaires d'amplification à travers la voie intrinsèque/mitochondriale. D'autre part, l'activation des caspases et donc l'apoptose sont bloquées par une surexpression de Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) ou de Bcl-XL. Dans ce cas, le clivage de la protéine Bid de la famille du Bcl-2 pour générer un Bid tronqué (tBid) et une libération consécutive de cytochrome c par la mitochondrie induite par tBid est effectuée par la caspase-8, ce qui a pour conséquence l'engagement de BAX ou BAK pour induire le MOMP (Gonzalvez and Ashkenazi, 2010) et permet une boucle d'amplification additionnelle (Luo et al., 1998).

### III. B. 2. Les facteurs de mort et leurs récepteurs : la superfamille du TNF



**Figure A2 : Les ligands et les récepteurs de la superfamille du TNF.**  
Modifié à partir de (Aggarwal, 2003)

L'activation de la voie apoptotique extrinsèque est initiée par l'interaction des récepteurs de mort à la surface des membranes, un sous-type de la superfamille des récepteurs de facteurs de nécrose tumorale (TNF) (Zhang, 2004), avec leurs spécifiques ligands activateurs (connus aussi sous le nom de ligands de mort), qui appartiennent aussi à la famille des protéines TNF. Le premier membre de la superfamille du TNF à avoir été identifié est le TNF $\alpha$  et le TNF $\beta$  /Lymphotoxin  $\alpha$  (LT- $\alpha$ ). A ce jour, 19 ligands de la superfamille du TNF ont été identifiés ainsi que 32 récepteurs de cette même famille. Il existe plusieurs couples récepteur/ligand impliqués dans l'apoptose, comme détaillé dans la figure A2 (Locksley *et al.*, 2001).

La plupart des ligands de cette famille sont des protéines transmembranaires de type II composées d'environ 150 acides aminés et qui possèdent 20 à 25 % d'homologie avec les autres membres de la famille du TNF et dont l'extrémité C-terminale est du côté extracellulaire. Ce domaine peut être clivé par des métalloprotéases spécifiques afin de générer des cytokines solubles. Les ligands membranaires ou solubles sont actifs sous la forme d'homo- ou d'hétérodimères non-covalents. Les ligands sont caractérisés par une tige de longueur variable liant le domaine transmembranaire à la région centrale, qui contient le domaine d'homologie TNF (THD = TNF homology domain) (Bodmer *et al.*, 2002), considéré comme la caractéristique commune des ligands de la superfamille du TNF.

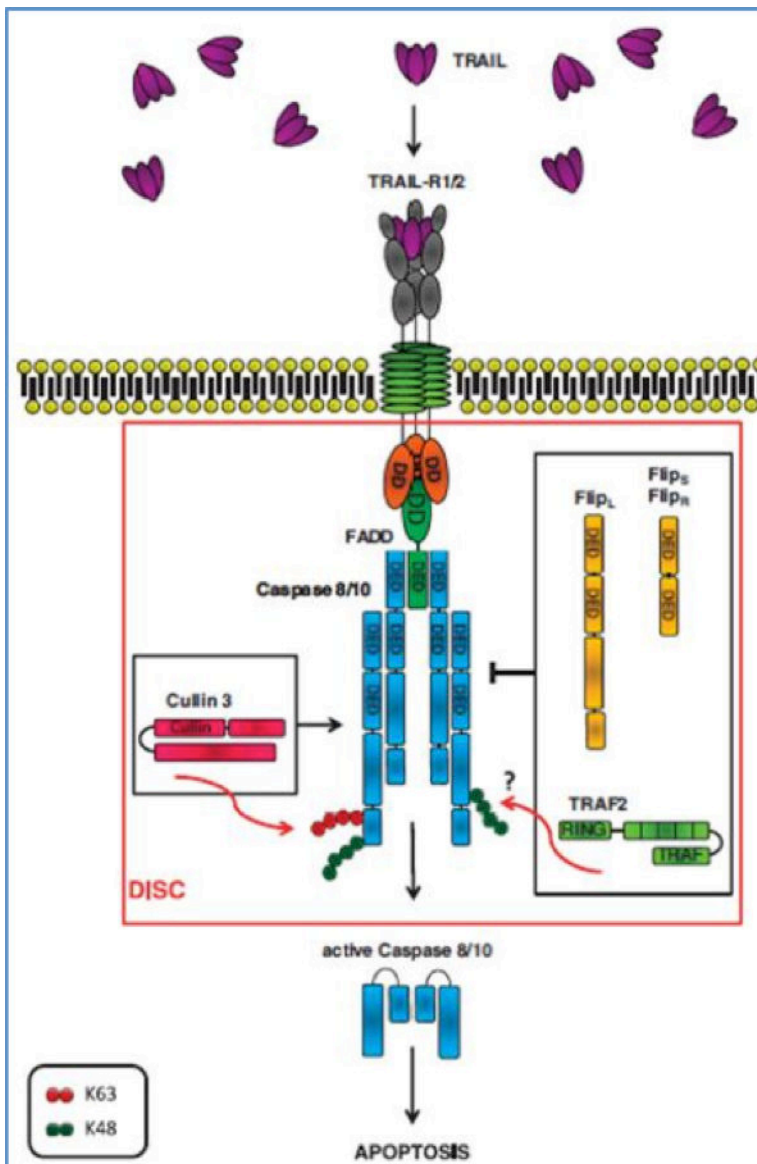
Les récepteurs de cette famille sont des protéines oligomériques transmembranaires de type I ou de type II possédant un domaine extracellulaire contenant une à six régions riches en cystéines. Cette famille de récepteurs peut promouvoir, selon le contexte cellulaire, la survie ou la mort cellulaire, ou les deux (Gaur and Aggarwal, 2003). Ainsi, les récepteurs induisant la mort (les récepteurs de mort) contiennent des domaines de mort intracellulaires homologues d'environ 80 acides aminés qui recrutent les protéines impliquées dans la voie d'activation des caspases. Les récepteurs de mort se trimérisent avant ou pendant la fixation à leur ligand et transmettent le signal apoptotique en aval.

Les autres membres de la famille du TNF qui ne possèdent pas de domaine de mort se lient aux TRAF et activent des signaux intracellulaires qui peuvent mener à la différenciation ou la prolifération. Ces récepteurs peuvent aussi initier l'apoptose par des mécanismes indirects. La trimérisation des récepteurs de mort est indépendante de la fixation des ligands sur ces derniers (Guicciardi and Gores, 2009).

### III. B. 3. Régulation de la voie extrinsèque de l'apoptose : c-FLIP

La majorité des signaux qui inhibent la caspase-8 le font en affectant le recrutement de la caspase-8 par le complexe DISC ; comme avec le recrutement de la protéine anti-apoptotique

FLIP. Les FLIP virales (v-FLIP) ont tout d'abord été identifiés dans plusieurs virus g-herpes (Thome et al., 1997). Elles possèdent une activité anti-apoptotique permettant aux virus d'échapper aux réponses apoptotiques antivirales de l'hôte. Par la suite, un homologue cellulaire des v-FLIP a été identifié : le c-FLIP (Cellular FADD-like interleukin-1 b-converting enzyme-like protease (FLICE)-inhibitory proteins). Dix variants épissés de FLIP ont été identifiés, mais seulement trois ont été détectés chez les humains : deux variants courts, c-FLIP<sub>S</sub> et c-FLIP<sub>R</sub>, et un variant long c-FLIP<sub>L</sub> (Thome et al., 1997).



**Figure A3: TRAIL induit la formation du DISC.** La fixation du trimère de TRAIL sur son récepteur trimérique DR4/5 entraîne le recrutement de la molécule adaptatrice FADD, par son DD. FADD recrute la pro-caspase-8/10 par les DED, ce qui initie l'apoptose. C-FLIP inhibe la formation du DISC en entrant en compétition avec la caspase-8. Modifié à partir de (Lemke et al., 2014)

A haute concentration et en réponse à la ligation des DR, les trois isoformes de c-FLIP peuvent être recrutées par le DISC par des interactions DED avec le FADD. c-FLIP possèdent des similarités structurales avec les caspases-8 et -10 ; cependant, FLIP ne possède pas les résidus cystéines à activité catalytique et donc n'ont pas d'activité protéase (Krueger et al., 2001; Thome and Tschopp, 2001). Ainsi, c-FLIP est recruté au niveau du DISC et bloque l'activation des caspases initiatrices en entrant en compétition avec elles, en s'associant avec le FADD (Irmler et al., 1997;



Thome *et al.*, 1997 ). c-FLIP<sub>S</sub> est composé de deux motifs DED en tandem avec une courte queue en C-terminal et inhibe la mort induite par les DR. A l'inverse, c-FLIP<sub>L</sub> possède deux motifs DED du côté N-terminal et deux domaines ressemblant aux caspases donc la fonction catalytique est inactive du côté C-terminal. La fonction de c-FLIP<sub>L</sub> au niveau du DISC est plus complexe ; même si la surexpression de c-FLIP<sub>L</sub> protège les cellules de l'apoptose en entrant en compétition avec les caspase-8 et -10, une expression à de plus faibles quantités de c-FLIP<sub>L</sub> induit l'activation de la caspase-8 en formant un hétérodimère avec ce dernier et provoque l'apoptose (Micheau *et al.*, 2002). Ainsi, si c-FLIP<sub>L</sub> est anti-apoptotique à haute concentration, il a été montré qu'à faibles concentrations plus proches des niveaux physiologiques, c-FLIP<sub>L</sub> induit l'apoptose (Yu *et al.*, 2009). En plus d'inhiber les signaux apoptotiques, c-FLIP est impliqué dans les mécanismes de survie cellulaire comme la prolifération, la migration et la survie cellulaire. La surexpression de c-FLIP<sub>L</sub> active diverses protéines impliquées dans ces mécanismes, notamment les TRAF, NF-κB et ERK mais aussi à la kinase de survie AKT (=PKB = Protein Kinase B) ce qui réduit la phosphorylation de GSK3β (Glycogen synthase kinase 3 β) et donc diminue l'expression de la caspase-3.

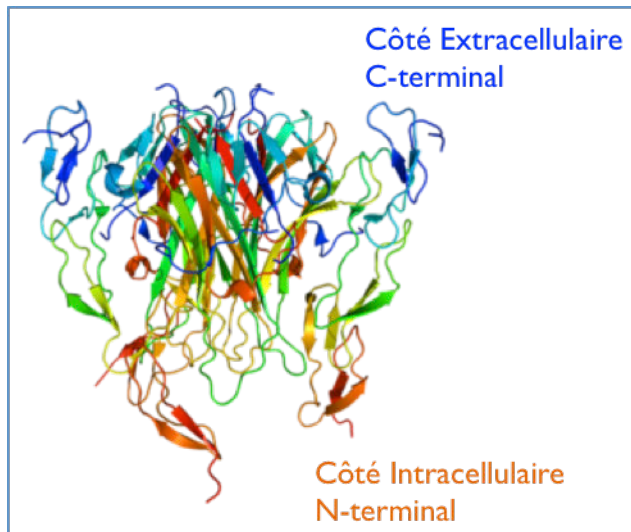
Certaines études suggèrent que FLIP est un inhibiteur de l'activation de la caspase-8 au niveau du DISC (Irmeler *et al.*, 1997), d'autres études ont trouvé des corrélations entre les niveaux de FLIP et la résistance des cellules à TRAIL. (Griffith and Lynch, 1998).

## **IV. TRAIL : UN LIGAND INDUCTEUR DE MORT**

### **IV. A. POLYMORPHISME ET STRUCTURE DU GÈNE CODANT POUR TRAIL**

TRAIL (Apo2L, CD253, TNFSF10) a été découvert par deux groupes indépendants, qui se sont basés sur son homologie de séquence avec TNF et Fas/CD95L (Pitti *et al.*, 1996; Wiley *et al.*, 1995 ). TRAIL est différent selon les espèces ; chez l'homme il est sous forme d'une protéine membranaire de 281 acides aminés et environ 33-35 kDa. TRAIL peut être sous forme membranaire (mTRAIL) ou être clivé par des protéases à cystéine pour former un ligand soluble (sTRAIL) extracellulaire que l'on retrouve dans le surnageant de culture des PBMC activées (Liabakk *et al.*, 2002). Le gène du TRAIL est localisé à la position 3q26 du chromosome 3. Le locus du gène occupe environ 20 kb et est composé de cinq exons et de quatre introns (Almasan and Ashkenazi, 2003). Une structure de TRAIL cristallisé a été obtenue (Cha *et al.*, 1999a; Cha *et al.*, 1999b ; Hymowitz *et al.*, 1999). Quatre polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP, single-nucleotide polymorphism) dans la région régulatrice 5' et quatre SNP dans la région 3'UTR dans le gène de TRAIL ont été décrits (Gray *et al.*, 2001). Il a aussi été reporté qu'il existe une région hautement polymorphique dans le promoteur de TRAIL avec quatre SNP. Cependant, ce

polymorphisme n'a pas d'influence sur l'expression de TRAIL chez les patients avec de multiples scléroses (Weber *et al.*, 2004). Un important polymorphisme aux nucléotides 1595 dans la région 3'UTR a été identifié dans différentes populations et associé avec une susceptibilité aux multiples scléroses. Cependant, son rôle dans le développement et la progression du cancer du sein n'est pas clairement établi. Il existe 9 variants de TRAIL mais une seule isoforme spécifique de TRAIL est active, la forme possédant tous les exons.



**Figure A4 : Structure cristallographique de TRAIL selon le modèle 1D0G.**

Modifié à partir de (Hymowitz *et al.*, 1999)

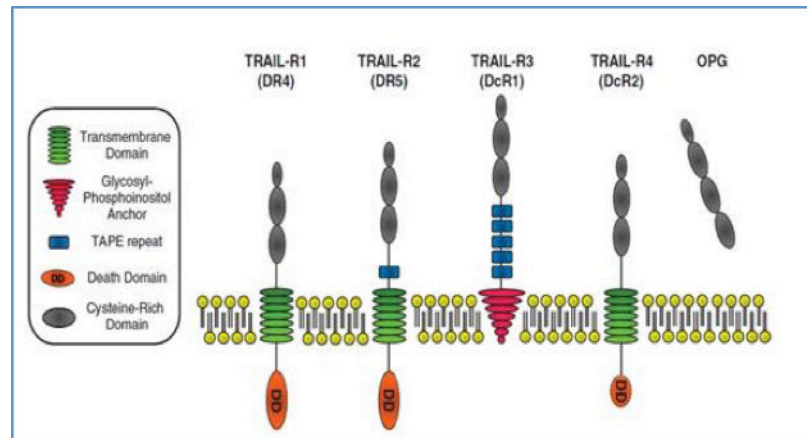
TRAIL présente une faible homologie de séquence avec les autres membres de la superfamille du TNF (seuls 38 acides aminés sur 168 sont conservés), cependant le domaine extracellulaire C-terminal, partie active de la protéine, est similaire à celui des autres membres de la famille du TNF. Un monomère de TRAIL est constitué de deux feuillets  $\beta$  antiparallèles qui forment un sandwich  $\beta$  et interagit avec les sous-unités adjacentes tête-bêche pour former un homotrimère en forme de cloche. TRAIL est formé d'un domaine extracellulaire, composé d'une tige extracellulaire et d'une hélice, possédant le C-terminal conservé et contenant un domaine de fixation au récepteur, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique contenant le N-terminal (Smith *et al.*, 1994). TRAIL possède un ion zinc essentiel à l'interface de ces trimères (Hymowitz *et al.*, 1999) qui sont liés par le résidu cystéine non-apparié (Cys-230) de chaque monomère (Bodmer *et al.*, 2000), qui quand elle est mutée affecte fortement l'activité de TRAIL.

#### IV. B. LES RÉCEPTEURS DE TRAIL

A ce jour, cinq récepteurs auxquels TRAIL peut se lier ont été identifiés chez l'homme: les récepteurs de mort (Death Receptor) – DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2) – et les récepteurs

leurres (Decoy Receptor) – DcR1 (TRAIL-R3), DcR2 (TRAIL-R4) et l'ostéoprotégérine (OPG) (Degli-Esposti et al., 1997a; Degli-Esposti et al., 1997b; Pan et al., 1997).

TRAIL possède plusieurs récepteurs de mort distincts contrairement à FAS/FASL ce qui démontre la complexité et la finesse de la fonction de TRAIL. A la température corporelle, l'affinité de TRAIL est plus élevée pour DR5, puis pour DR4, puis pour les récepteurs leurres et enfin pour l'OPG.



**Figure A5 : Les récepteurs de TRAIL.** TRAIL peut se fixer à l'un de ses 5 récepteurs. DR4 et DR5 peuvent induire l'apoptose *via* leur domaine de mort DD. A l'inverse, DcR1, DcR2 et OPG fixe TRAIL mais n'induisent pas la mort en raison de l'absence de DD fonctionnels.  
Modifié à partir de (Lemke et al., 2014)

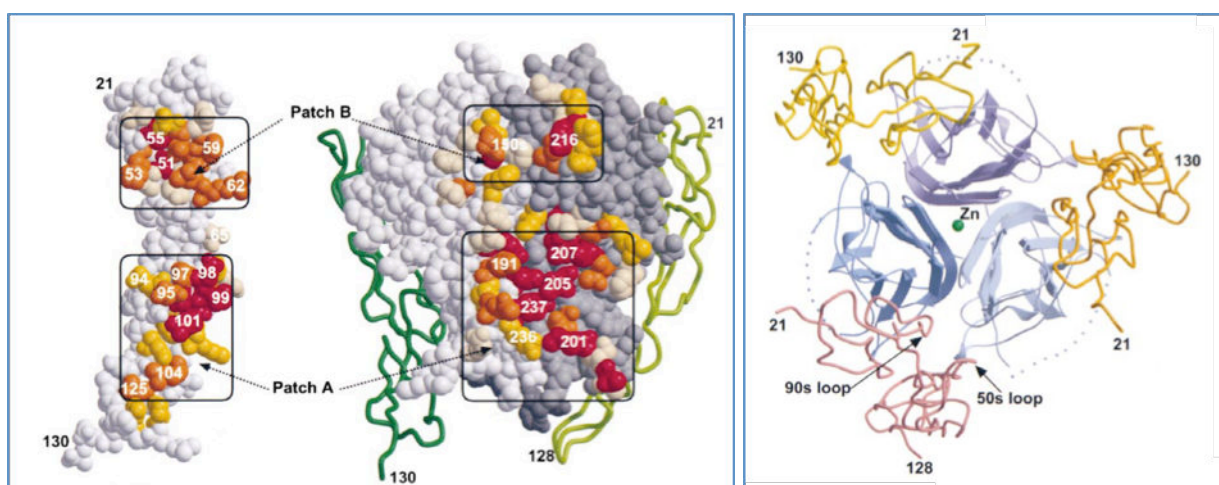
#### IV. B. I. Les récepteurs de mort

##### IV. B. I. i. Death Receptors 4 et 5

DR4 et DR5 sont des protéines transmembranaires de type I, comme la plupart des récepteurs de la superfamille du TNF. Pan et al. ont identifié en 1997 le premier récepteur à TRAIL, DR4 (Pan et al., 1997). Puis, plusieurs groupes ont identifié un second récepteur pour TRAIL, nommé DR5 (MacFarlane et al., 1997; Walczak et al., 1997). DR4 et DR5 possèdent dans leur domaine cytoplasmique un domaine de mort d'environ 80 acides aminés, proche de celui trouvé dans TNF-R1 et Fas. DR4 et DR5 partagent 58% d'homologie de séquences, cependant la fonction distincte de ces deux protéines n'est pas encore établie. DR4 et DR5 sont exprimés dans de nombreux tissus et lignées cellulaires normales et transformées, mais pas tous les tissus ou les cellules qui expriment ces récepteurs sont sensibles à TRAIL. DR4 et DR5 ont pour fonction principale d'induire une réponse de mort de type apoptotique après la liaison de TRAIL dans une variété de cellules tumorales primaires *in vitro* et *in vivo* indépendamment de p53 (Almasan and Ashkenazi, 2003; Baetu and Hiscott, 2002).

Cependant, DR4 et DR5, comme d'autres membres de la famille du récepteur du TNF possèdent des domaines de mort intracytoplasmiques, qui pourraient être impliqués dans des fonctions non apoptotiques (Park *et al.*, 2005). En effet, TRAIL a la capacité d'induire une mort cellulaire programmée non apoptotique (autophagie, nécrose...) quand la machinerie est inhibée (Broker *et al.*, 2005).

Le gène DR5 est localisé sur le chromosome humain à la position 8p2-21 et l'ARNm de DR5 est très largement exprimé. DR5 contient deux motifs extracellulaires riches en cystéine (cystein-rich extracellular domain = CRD), typiques des membres de la famille des TNFR (Hymowitz *et al.*, 1999; Mongkolsapaya *et al.*, 1999). DR5 possède une forme allongée maintenue par sept ponts disulfures.



**Figure A6 : L'interaction entre TRAIL et ses récepteurs de mort.**

Modifié à partir de (Hymowitz *et al.*, 1999)

#### IV. B. I. ii. Interaction et structure de TRAIL avec les récepteurs de mort

Un trimère de TRAIL se lie à trois récepteurs pour former un complexe hexamérique (Mongkolsapaya *et al.*, 1999). Les trois récepteurs se lient à l'interface entre deux monomères de TRAIL (Hymowitz *et al.*, 1999). La structure de TRAIL lorsqu'il est lié à DR5 est très proche de sa structure en tant que ligand libre, même s'il existe des altérations dans la conformation de plusieurs boucles de surface dues à l'interaction. Deux boucles du récepteur DR5 induisent la plupart des interactions, ce qui divise l'interface en deux patches distincts : la « boucle 50s » (patch B, des résidus 51-65) et la « boucle 90s » (patch A des résidus 91-104). Dans le patch A, la boucle interagit avec un groupe de résidus de TRAIL autour de la glutamine (Gln=Q)-205 vers le bas du complexe, alors que dans le patch B, la boucle interagit avec un groupe de résidus de TRAIL autour de la Tyr-216 vers le haut du complexe. De façon générale, le patch B fait appel aux caractéristiques hydrophobes du ligand et a un rôle important dans l'interaction du complexe ;

contrairement au patch A, le plus grand des deux, qui contrôle la spécificité et la cross-réactivité. La plupart des résidus identifiés comme les plus importants pour la fonction biologique (comme la glutamine (Gln=Q)-205 et l'acide glutamique (Glu=E)-236 sont situés dans le patch A (Hymowitz *et al.*, 2000).

#### IV. B. I. iii. Signalisation: cascade extrinsèque de l'apoptose

La signalisation de TRAIL est complexe ; elle comprend au moins 6 voies de signalisation qui convergent et divergent et qui participent à l'état général pro- ou anti-apoptotique. Cette complexité permet une régulation fine par l'hôte mais aussi une manipulation par les virus. En effet, les virus participent à l'initiation ou à la prévention de l'apoptose par la cellule hôte en fonction de si la réplication virale maximale et la dissémination repose sur la mort cellulaire ou la préservation cellulaire et de la latence. D'autre part, la multiplicité de cette cascade de signalisation permet à l'hôte d'éviter d'être manipulé par les pathogènes. (Cummins and Badley, 2009)

Les récepteurs DR sont préassemblés en oligomères avant leur ligation aux ligands. La cascade de signalisation induite par TRAIL après fixation à son DR s'effectue de la même façon que pour la plupart des membres de la superfamille du TNF. Lorsque TRAIL membranaire ou soluble interagit avec l'un de ses récepteurs de mort fonctionnels, cela va induire la formation d'un complexe hexamérique, pour former ainsi le DISC (Micheau and Tschopp, 2003). Le DISC est composé des récepteurs oligomérisés, la protéine adaptatrice FADD, la caspase-8 et/ou -10 et en fonction du contexte, la protéine cellulaire c-FLIP. Après la ligation, les domaines de mort intracellulaires DR4 et DR5 sont capables d'établir des interactions monovalentes homotypiques avec les domaines effecteurs de mort (DED = death effector domains). Il existe sept protéines contenant un DED: FADD, caspase-8 and 10, c-FLIP, death effector domain containing DNA binding (DEDD), DEDD2 et les astrocytes enrichis en phosphoprotéines de 15-Kda (PEA-15) (Reed *et al.*, 2004). A la surface membranaire des cellules, les ligands apparentés de la famille du TNF interagissent avec un des récepteurs de mort afin d'attirer les molécules contenant un motif DD, les FADD ou les TRADD (TNF receptor-associated death domain). Le recrutement du FADD engendre la voie de signalisation pro-apoptotique, alors que les TRADD induisent des signaux anti-apoptotiques. Le FADD attire d'autres protéines contenant des motifs DD/DED, comme les pro-caspases-8 et -10, afin de promouvoir la formation du DISC dans le compartiment cytoplasmique. A l'opposé, TRADD se lie et forme le complexe I avec le RIP1 (receptor interacting protein-1), TRAF2, TRAF5 et les protéines inhibitrices cIAP1/2 (inhibitor of apoptosis protein-1 and -2) (Micheau and Tschopp, 2003). Ce complexe module les signaux de survie, comme ceux modulés par NF- $\kappa$ B, JNK et p38. Cependant, dans certaines circonstances, RIP1 est

déubiquitinilé par l'enzyme cylindromatosis (CYLD), se qui mène à la dissociation de RIP1 et de TRADD du complexe I. RIP1 et TRADD se fixe ensuite à FADD et aux caspases -8 et -10 pour faire le complexe II. Une fois les caspases-8 et -10 activées elles amplifient le signal de mort, soit par l'activation directe des caspases effectrices -3, -6 et -7 soit en promouvant l'engagement de BID par BAX et BAK afin d'activer la voie apoptotique intrinsèque.

#### IV. B. 2. Les récepteurs leurres: Decoy Receptors 1 et 2 et l'ostéoprotégérine

##### IV. B. 2. i. Interaction de TRAIL avec les récepteurs leurres

DcR1 est une protéine transmembranaire de type III tandis que DcR2 est une protéine transmembranaire de type I, à laquelle il manque un peptide signal, et l'OPG est sécrétée en tant que protéine soluble (Gonzalvez and Ashkenazi, 2010). DcR1 a été le troisième récepteur de TRAIL à avoir été identifié (Gonzalvez and Ashkenazi, 2010). DcR1 est une protéine de 299 acides aminés et il est ancré à la surface de façon covalente par une molécule de glycosylphosphatidylinositol (GPI), ce qui pour conséquence l'absence d'un domaine intracellulaire et donc du segment cytoplasmique DD. DcR2 a été le quatrième récepteur de TRAIL à avoir été identifié (Degli-Esposti et al., 1997a). Bien que DcR2 ait un domaine transmembranaire qui contient un domaine de mort, ce dernier est tronqué, ce qui le rend incapable d'induire les signaux intracellulaires de mort. Le récepteur DcR2 permet la formation du DISC mais empêche l'activation de la caspase 8 (Degli-Esposti et al., 1997a). Avec toutes ces caractéristiques, DcR1 et DcR2 ont été considérés comme récepteurs "leurres" (decoy) régulant négativement l'activité de TRAIL en entrant en compétition avec DR4 et DR5 pour la liaison avec le ligand (Zhang et al., 2000). Bien que les deux récepteurs DcR1 et DcR2 partagent la même fonction inhibitrice, les deux récepteurs sont structurellement différents et agissent différemment sur l'inhibition de l'apoptose induite par TRAIL (Merino et al., 2006).

Le cinquième récepteur pour TRAIL est l'OPG, qui est une protéine soluble ; cependant il n'a pas de rôle dans l'apoptose (Emery et al., 1998). L'activité la mieux caractérisée pour l'OPG est l'inhibition de la formation d'ostéoclastes en bloquant l'interaction de RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) avec son récepteur membranaire RANK (Boyle et al., 2003). TRAIL se fixe à l'OPG avec une faible affinité, ce qui régule la différenciation et la survie des ostéoclastes matures.

##### IV. B. 2. ii. Signalisation: protection cellulaire

Les mécanismes par lesquels les DcR inhibent l'apoptose sont complexes et dépendent du contexte cellulaire. Certaines hypothèses ont été émises, notamment sur la distribution des

récepteurs leurres ou de mort en fonction des types cellulaires. En effet, contrairement aux récepteurs agonistes DR4 et DR5 exprimés préférentiellement par les cellules tumorales, il a été montré que les DcR étaient surexprimés dans les cellules normales et régulés négativement dans les cellules tumorales (Spierings *et al.*, 2004). D'autres études ont montré l'implication de DcR1 et DcR2 dans la résistance à TRAIL. En effet, DcR1 et DcR2 peuvent être exprimés de manière plus importante dans les tumeurs primaires.

D'autre part, il a été montré que DcR1 est localisé dans des membranes riches en cholestérol. Il peut lier TRAIL de façon efficace et altérer l'assemblage de DISC. Une grande fraction de TRAIL est maintenue par séquestration dans ces lipides rafts, qui n'est alors plus disponible pour sa fixation aux DR. DcR1 entre ainsi en compétition avec DR4/5 pour la fixation de TRAIL. Parallèlement, il a été montré que DcR2, contrairement à DcR1, induit la formation du DISC initiée par DR5 et que DcR2 peut interagir avec DR5. Cependant, il n'est pas clair si l'interaction entre DcR2 et DR5 qui se fait spontanément par le PLAD (pré-ligand-associated domain) et est nécessaire à l'inhibition de la mort induite par TRAIL (Clancy *et al.*, 2005) ou si l'interaction entre DcR2 et DR5 est indirecte et nécessite la présence de TRAIL (Merino *et al.*, 2006). Dans les deux cas, DcR2 provoque une gêne stérique dans la formation du DISC ce qui empêche l'activation de la caspase-8 suite à la fixation de TRAIL sur DR5 et donc bloque l'activation de la voie de l'apoptose (Merino *et al.*, 2006).

## **ARTICLE N°5:**

### **Restauration de l'apoptose induite par TRAIL dans une lignée cellulaire pancréatique par un nouvel inhibiteur de FAK, PHI I**

Dao P\*, Smith N\*, Scott-Algara D, Garbay C, Herbeuval JP, Chen H.

**Manuscrit publié** dans **Cancer Letter**

## **ARTICLE N°6:**

### **Design, synthèse et évaluation d'un nouvel imidazo[1,2-a][1,3,5]triazines et ses dérivés en tant qu'inhibiteurs de la FAK avec une activité anti-tumorale**

Dao P, Smith N, Tomkiewicz-Raulet C, Yen-Pon E, Camacho-Artacho M, Lietha D, Herbeuval JP, Coumoul X, Garbay C, Chen H.

**Manuscrit publié** dans **Journal of Medicinal Chemistry**

## **ARTICLE N°7:**

### **Inhibition de la voie de signalisation de FAK et FGFR2 induit des activités anti-tumorales et anti-angiogéniques**

Dao P, Jarray R, Smith N, Lepelletier Y, Le Coq J, Lietha D, Hadj-Slimane R, Herbeuval JP, Garbay C, Raynaud F\*, Chen H\*.

**Manuscrit publié** dans **Cancer Letter**

**Introduction:** Il a été identifié dans un grand nombre de tumeurs des voies de signalisation clés qui fonctionnent indépendamment pour promouvoir le développement du cancer. Cependant le blocage spécifique d'une des kinases impliquées dans ces voies de signalisation ne provoque qu'une réponse limitée aux traitements. Ainsi, il serait intéressant de comprendre la complexité des signaux transduits. Par ailleurs, le blocage simultané de plusieurs kinases clés tend à optimiser les effets thérapeutiques potentiels associés aux agents anticancéreux spécifiques. Ainsi, une stratégie est de développer des inhibiteurs qui ciblent plusieurs tyrosines kinases. Un des avantages de cette approche est d'augmenter l'efficacité et de réduire les résistances. A la différence des thérapies combinatoires impliquant plusieurs molécules pour chacune des cibles, la thérapie multi-cibles



permet de réduire le nombre de médicaments et les risques des interactions médicaments-médicaments. Cependant, il est difficile d'obtenir des molécules suffisamment spécifiques de différentes cibles sans grande toxicité pour l'organisme. Parmi les cibles les plus étudiées en chimiothérapie anticancéreuse, on peut citer Focal adhesion kinase (FAK) et Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2). En effet, l'activité de FAK est étroitement liée à la progression des tumeurs et des métastases dans un grand nombre de modèles tumoraux. D'autre part, FGF et ses récepteurs sont impliqués dans de nombreuses voies de signalisation qui contribue à la carcinogénèse et affecte la survie, la migration et la prolifération cellulaire, mais aussi joue un rôle dans l'angiogénèse. Dans notre première étude nous nous sommes ainsi intéressés à l'activité anti-tumorale et anti-angiogénique d'un nouveau composé, PHM16, un inhibiteur compétiteur d'ATP de plusieurs tyrosines kinases, notamment FAK et FGFR2, en comparaison à l'inhibiteur connu de FAK, le TAE-226. Par la suite, nous nous sommes intéressés au développement d'autres composés proches de la structure de l'inhibiteur de FAK connu, le TAE-226, appartenant à la famille des imidazo[1,2-a][1,3,5]triazines.

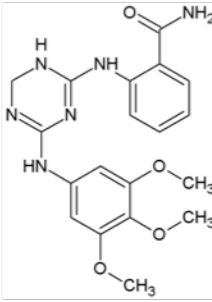
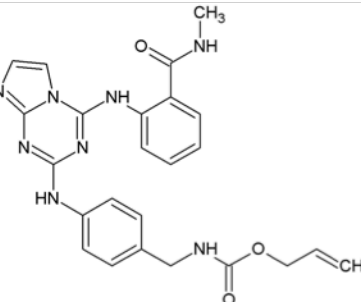
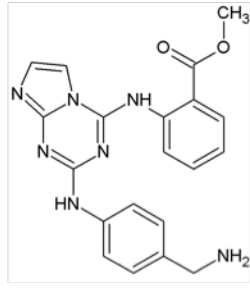
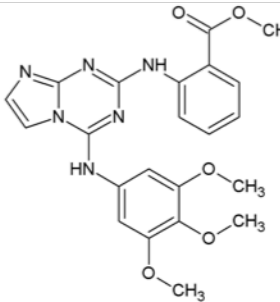
Le ligand (TNF)-related apoptosis-inducing (TRAIL), de la superfamille du TNF est un candidat très prometteur dans les traitements contre le cancer grâce à son induction très régulée de l'apoptose. En effet, TRAIL possède 2 récepteurs de mort DR4 et DR5 (Death Receptor) mais aussi 3 récepteurs leurres, DcR1, DcR2 (Decoy Receptor) et OPG. Normalement, les cellules normales expriment plus de récepteurs leurres que les cellules tumorales afin d'être protégées. DR4 et DR5 induisent l'apoptose en induisant la formation du complexe DISC qui est composé par un domaine de mort, le FADD et les pro-caspases 8 et 10. Ces pro-caspases vont alors être clivées afin d'activer les caspases effectrices comme la caspase-3 menant à la voie extrinsèque de l'apoptose. L'immunothérapie par TRAIL représente une alternative dans le cas de tumeurs résistantes aux thérapies conventionnelles. Le cancer du pancréas est extrêmement mortel et est souvent diagnostiqué dans des phases avancées. De plus, ce cancer est résistant aux thérapies conventionnelles, il serait donc intéressant d'appliquer plutôt l'immunothérapie à base de TRAIL. Cependant, les cellules cancéreuses pancréatiques sont aussi résistantes à TRAIL en raison de l'augmentation de la protéine pro-apoptotique c-FLIP qui inhibe l'induction de la voie de signalisation de l'interaction TRAIL/DR5. Il a par ailleurs été montré que c-FLIP est régulé par la voie de survie PI3K/AKT qui elle-même est régulée par FAK. Ainsi, nous avons sélectionné un composé de la famille des dérivés triaziniques synthétisés, le PH11 afin d'évaluer son rôle dans la restauration de l'apoptose par TRAIL dans une lignée cancéreuse pancréatique, les PANC-1.

**Méthode:** Les différents composés ont été synthétisés dans le laboratoire. La structure cristalline de FAK avec PHM16 a été obtenue en collaboration, et a permis de déterminer les différentes modifications afin d'augmenter l'efficacité de nos molécules. Le composé PHM16 a été testé sur diverses lignées cellulaires HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells), U-87MG, HCT-116, MDA-MB-231 et PC-3. Les composés 19a et 21a ont été testés sur des U-87MG et HCT-116. Le composé PH11 a lui été testé sur les PANC-1 et les MIAPACA-2. Les inhibitions enzymatiques ont été testées selon un test radioactif ou selon un TR-FRET ou FACE FAK Elisa. La phosphorylation de FGFR2, l'apoptose (Annexin V, 7AAD, PI) et le cycle cellulaire ont été évalués par FACS, mais aussi les niveaux de TRAIL et de ces récepteurs ainsi que les niveaux de c-FLIP et AKT. D'autre part, un siRNA c-FLIP ou FAK a été effectué.

**Résultats:** Nous avons pu montrer que PHM16 a un rôle angiogénique direct, inhibe la viabilité des cellules épithéliales, l'adhérence et induit l'apoptose des cellules HUVEC. De plus, PHM16 inhibe la prolifération cellulaire et supprime la tumorigénicité d'U - 87 MG, HCT-116, MDA-MB-231 et PC-3. Notre étude montre ainsi que notre composé PHM16 inhibe à la fois FAK et FGFR2, ce qui peut être une opportunité dans les applications possibles anti-tumorales. Le composé PHM16 a alors été optimisé et deux composés, 19a et 21a, ont montré une affinité intéressante pour FAK. D'autre part, ils inhibaient aussi la prolifération d'un panel de cellules cancéreuses comme U87-MG, HCT-116, MDA-MB-231 et PC-3 et sont capables d'arrêter le cycle

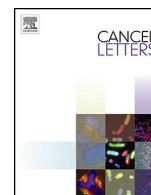
cellulaire des U87-MG et HCT-116. Le composé PH11 a été étudié dans la restauration de l'apoptose induite par TRAIL dans des PANC-1. Ainsi, en présence de PH11, les PANC-1 sont devenues sensibles à TRAIL - positive à l'Annexine V et à 7-AAD, activation de la caspases-8, -3 et -9 – et qu'un inhibiteur de caspase-3 inhibait cette apoptose. D'autre part, PH11 inhibe la phosphorylation de FAK, AKT et la présence de c-FLIP mais augmente tBid et PARP clivé. Enfin, le siRNA FAK et c-FLIP restaurent la mort de la même façon que PH11 indiquant que c'est bien le mécanisme utilisé.

Durant ces trois études, nous avons ainsi pu identifier une série de composés chimiques spécifiques de FAK et qui permettaient de (1) bloquer la prolifération des cellules cancéreuses et ainsi la progression du cancer et (2) restaurer la mort par TRAIL de cellules résistantes. Ces résultats très prometteurs permettent de mettre en place de nouvelles approches thérapeutiques lorsque les thérapies conventionnelles ne sont plus efficaces.

<b>PHMI6</b>	<b>19a</b>	<b>21a</b>	<b>PH11</b>
			

**Table A1** : Les composés de la famille des imidazo[1,2-a][1,3,5]triazines testés lors des différentes études





## Original Articles

## Restoration of TRAIL-induced apoptosis in resistant human pancreatic cancer cells by a novel FAK inhibitor, PH11

P. Dao <sup>a,1</sup>, N. Smith <sup>a,1</sup>, D. Scott-Algara <sup>b</sup>, C. Garbay <sup>a</sup>, J. P. Herbeuval <sup>a,1</sup>, H. Chen <sup>a,\*,1</sup><sup>a</sup> Chemistry & Biology, Nucleo(s)ptides & Immunology for Therapy (CBNIT), CNRS UMR8601, Université Paris Descartes, PRES Sorbonne Paris Cité, UFR Biomédicale, 45 rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cedex 06, France<sup>b</sup> Unité de Régulation des Infections Rétrovirales, Institut Pasteur, 25 rue de Dr Roux, 75724 Paris, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 28 May 2014

Received in revised form 13 January 2015

Accepted 3 February 2015

## Keywords:

Pancreatic cancer cell lines

TRAIL

FAK inhibitor

c-FLIP

PI3K/AKT pathway

## ABSTRACT

Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) emerges as one of the most-promising experimental cancer therapeutic drugs and is currently being tested in clinical trials. However, both intrinsic and acquired resistance of human cancer cells to TRAIL-induced apoptosis poses a huge problem in establishing clinically efficient TRAIL therapies. To assess the regulation of TRAIL-resistance in human pancreatic cancer cells, we studied the TRAIL resistant pancreatic cell line PANC-1. We show that treatment with PH11, a novel Focal Adhesion Kinase (FAK) inhibitor in association with TRAIL rapidly induces apoptosis in TRAIL-resistant PANC-1 cells, but not in normal human fibroblast cells. To explain sensitization, we showed that PH11 restores TRAIL apoptotic pathway in PANC-1 cells through down-regulation of c-FLIP via inhibition of FAK and the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/AKT pathways. These findings suggest that this combined treatment may offer an attractive therapeutic strategy for safely and efficiently treating pancreatic cancer.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## Introduction

Induction of tumor cell death by apoptotic molecules is one of the strategies that could be used to selectively reduce cancer cell proliferation without damaging normal tissue. The tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), a TNF superfamily member [1], is a very promising candidate for cancer treatment [2] due to its sophisticated way of inducing apoptosis [3,4]. TRAIL-induced apoptosis is finely regulated by the expression of two groups of receptors. The first group is composed of two receptors that lack a functional intracellular death domain and do not induce apoptosis (Decoy Receptors 1 and 2) and the second one by two receptors inducing apoptosis of targeted cells (Death Receptors 4 and 5, DR4/DR5) [5–7]. The vast majority of normal cells express higher levels of decoy receptors than cancer cells [8] and are therefore protected [3,9]. DR4 and DR5 induced apoptosis through the formation of a death inducing signaling complex (DISC) containing the death receptor, adapter proteins such as Fas-associated via death domain (FADD), and initiator caspases such as pro-caspase-8 or pro-caspase-10 [10–12]. Consequently, pro-caspase-8 or -10 are activated by autoproteolytic processing. These pro-caspases are then cleaved and

activate downstream effector caspases [13], such as caspase-3, leading to apoptosis via a signaling cascade known as the extrinsic pathway. Beside the extrinsic pathway, activated caspase-8 can also activate the intrinsic pathway through the process of Bid, a protein from the bcl-2 family to yield truncated Bid (tBid) [14]. tBid translocates to the mitochondria [15], mediates the release of multiple proapoptotic proteins, including cytochrome c, apoptosis-inducing factor thus linking the extrinsic to the intrinsic death signaling pathways [16]. Furthermore, one important difference between the apoptosis induced by TRAIL or by conventional chemotherapy and radiotherapy is that the latter primarily involves the mitochondrial pathway, which is largely dependent on cellular damage recognition by the tumor suppressor p53. However, it is now established that TRAIL activates apoptotic signaling even in cells in which p53 is deleted [17]. Therefore, TRAIL immunotherapy may represent an alternative way to eradicate tumors that are resistant to a wide range of conventional therapies [18].

Pancreatic cancer is a highly lethal disease and is usually diagnosed in an advanced stage. Therefore this cancer exhibits the worst prognosis of any major malignancy, with less than 5% survival rate after 5 years of diagnosis [19]. Despite advances in surgical and medical therapy, little improvement has been made on the mortality rate and the median survival of 6 months has largely remained unchanged [20]. One reason for the poor survival of pancreatic cancer is its resistance to most conventional therapies [21]. Thus, immunotherapy may represent a new strategy and preclinical studies have

\* Corresponding author. Tel.: +33 142 864 085; fax: +33 142 864 082.

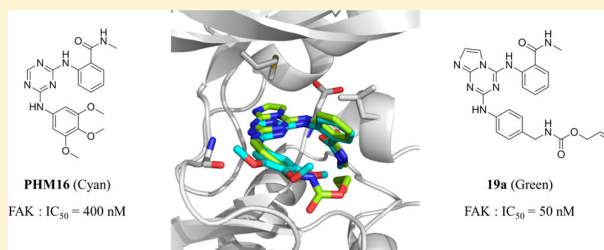
E-mail address: [huixiong.chen@parisdescartes.fr](mailto:huixiong.chen@parisdescartes.fr) (H. Chen).<sup>1</sup> Equally contributed to the work.



Design, Synthesis, and Evaluation of Novel Imidazo[1,2-*a*][1,3,5]triazines and Their Derivatives as Focal Adhesion Kinase Inhibitors with Antitumor ActivityPascal Dao,<sup>†</sup> Nikaia Smith,<sup>†</sup> Céline Tomkiewicz-Raulet,<sup>‡</sup> Expédite Yen-Pon,<sup>†</sup> Marta Camacho-Artacho,<sup>§</sup> Daniel Lietha,<sup>§</sup> Jean-Phillipe Herbeuval,<sup>†</sup> Xavier Coumoul,<sup>‡</sup> Christiane Garbay,<sup>†</sup> and Huixiong Chen<sup>\*,†,||</sup><sup>†</sup>Chemistry & Biology, Nucleo(s)tides & Immunology for Therapy (CBNIT), CNRS UMR8601, Université Paris Descartes, PRES Sorbonne Paris Cité, UFR Biomédicale, 45 rue des Saints-Pères, 75270 Cedex 06 Paris, France<sup>‡</sup>Toxicologie, Pharmacologie et Signalisation Cellulaire, INSERM, UMR S 1124, Université Paris Descartes, PRES Sorbonne Paris Cité, UFR Biomédicale, 45 rue des Saints-Pères, 75270 Cedex 06 Paris, France<sup>§</sup>Structural Biology and Biocomputing Programme, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Calle Melchor Fernández Almagro 3, Madrid 28029, Spain<sup>||</sup>School of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, no. 100 Waihuan Xi road, Education Mega Center, Guangzhou, 510006, China

## Supporting Information

**ABSTRACT:** A series of triazinic inhibitors of focal adhesion kinase (FAK) have been recently shown to exert antiangiogenic activity against HUVEC cells and anticancer efficacy against several cancer cell lines. We report herein that we further explored the heterocyclic core of these inhibitors by a fused imidazole ring with the triazine to provide imidazo[1,2-*a*][1,3,5]triazines. Importantly, these new compounds displayed  $10^{-7}$ – $10^{-8}$  M  $IC_{50}$  values, and the best inhibitor showed  $IC_{50}$  value of 50 nM against FAK enzymatic activity. Several inhibitors potently inhibited the proliferation of a panel of cancer cell lines expressing high levels of FAK. Apoptosis analysis in U87-MG and HCT-116 cell lines suggested that these compounds delayed cell cycle progression by arresting cells in the G2/M phase of the cell cycle, retarding cell growth. Further investigation demonstrated that these compounds strongly inhibited cell-matrix adhesion, migration, and invasion of U87-MG cells.



## INTRODUCTION

Focal adhesion kinase (FAK), a cytoplasmic tyrosine kinase and scaffold protein localized to focal adhesions, is uniquely positioned at the convergence point of integrins and receptor tyrosine kinase signal transduction pathways, which transmit signals from the extracellular matrix (ECM) to the cell cytoskeleton. FAK has been identified as a key pathogenic mediator of a variety of diseases. The most widely studied disease in this regard is cancer. This protein is emerging as a promising therapeutic target because it is highly expressed at both the transcriptional and translational level in various cancers. Ample evidence has indicated that FAK signaling pathways can stimulate tumor progression and metastasis through their regulation of cell migration, invasion, ECM, and angiogenesis (for a recent review of FAK, refer to refs 1–4). The initial attempts at inhibition focused upon down-regulation of FAK expression, demonstrating that silencing FAK by transfection of dominant-negative C-terminal FAK-CD decreased adhesion, colonization, and tumor growth in breast cancer cells.<sup>5</sup> Similarly, the inhibition of FAK expression with

antisense oligonucleotides and siRNA to FAK led to cell rounding, detachment, reduction of invasion, increased apoptosis, and finally induced *in vivo* tumorigenesis.<sup>6,7</sup> It was also observed that in two transgenic mouse models there is a strong correlation between FAK expression and late-stage tumorigenesis, indicating that FAK is required for progression of early tumors to late-stage adenocarcinoma.<sup>8,9</sup> These studies confirmed scientific rationale for further development of FAK inhibitors as anticancer agents.

FAK has also been involved in angiogenesis as an important modulator during development, as evidenced by the early embryonic lethality of mice engineered to harbor an endothelial specific deletion of this protein.<sup>10</sup> FAK signaling pathway was connected to increased production of vascular endothelial growth factor (VEGF) and urokinase plasminogen activator, known factors involved in tumor progression.<sup>11,12</sup> It was

Special Issue: New Frontiers in Kinases

Received: May 20, 2014

Published: September 2, 2014





Contents lists available at ScienceDirect

Cancer Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/canlet](http://www.elsevier.com/locate/canlet)

## Inhibition of both focal adhesion kinase and fibroblast growth factor receptor 2 pathways induces anti-tumor and anti-angiogenic activities



Pascal Dao<sup>a</sup>, Rafika Jarray<sup>a</sup>, Nikaia Smith<sup>a</sup>, Yves Lepelletier<sup>b</sup>, Johanne Le Coq<sup>c</sup>, Daniel Lietha<sup>c</sup>, Réda Hadj-Slimane<sup>d</sup>, Jean-Philippe Herbeuval<sup>a</sup>, Christiane Garbay<sup>a</sup>, Françoise Raynaud<sup>a,\*</sup>, Huixiong Chen<sup>a,e,\*</sup>

<sup>a</sup> CNRS, UMR8601, Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, CBNIT, Université Paris Descartes, PRES Sorbonne Paris Cité, UFR Biomédicale, 45 rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cedex 06, France

<sup>b</sup> UMR CNRS 8147, Université Paris Descartes, PRES Sorbonne Paris Cité, Hôpital Necker, 149, rue de Sèvre, 75743 Paris Cedex 15, France

<sup>c</sup> Structural Biology and Biocomputing Programme, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Calle Melchor Fernández Almagro 3, Madrid 28029, Spain

<sup>d</sup> Visiotact Pharma, 13-17, rue Moreau, 75012 Paris, France

<sup>e</sup> School of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, No. 100 Waihuan Xi Road, Education Mega Center, Guangzhou 510006, China

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 October 2013

Received in revised form 7 February 2014

Accepted 7 March 2014

#### Keywords:

FAK

FGFR2

Inhibitor

Angiogenesis

Cancer

### ABSTRACT

FAK and FGFR2 signaling pathways play important roles in cancer development, progression and tumor angiogenesis. PHM16 is a novel ATP competitive inhibitor of FAK and FGFR2. To evaluate the therapeutic efficacy of this agent, we examined its anti-angiogenic effect in HUVEC and its anti-tumor effect in different cancer cell lines. We showed PHM16 inhibited endothelial cell viability, adherence and tube formation along with the added ability to induce endothelial cell apoptosis. This compound significantly delayed tumor cell growth. Together, these data showed that inhibition of both FAK and FGFR2 signaling pathways can enhance anti-tumor and anti-angiogenic activities.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### Introduction

A number of tumor models have identified several key cellular signaling pathways that work independently, in parallel, and/or through interconnections to promote cancer development. Highly selective or specific blocking of only one of the kinases involved in these signaling pathways has been associated with limited or sporadic responses in human cancer therapy. Improved understanding of the complexity of signal transduction processes and their roles in cancer has suggested that simultaneous inhibition of several deregulated key kinases may help to optimize the overall therapeutic benefit associated with molecularly targeted anticancer agents. Therefore, one strategy for the development of improved treatments in oncology is the development of multi-targeted tyrosine kinase inhibitors (TKIs), which represent a potentially attractive approach for targeting multiple signaling pathways

for a given cancer. One advantage of multi-targeted TKIs is the potential for increased efficacy and reduced resistance by simultaneous inhibition of multiple pathways and common escape pathways. Compared to combination therapy involving multiple single targeted TKIs, multi-targeted TKIs reduce the number of drugs the patient is required to take, decrease the risk of drug–drug interactions and increase the likelihood of patient compliance. Imatinib is the first approved anticancer drug that may be considered as a multi-targeted TKI. Its targets include KIT, platelet-derived growth factor receptor, and BCR-Abl fusion protein [1]. Currently, a variety of other investigational multi-targeted TKIs are at different stages of development [2,3]. However, the use of multi-targeted drugs is not without limitations. Potential limitations include difficulties to obtain sufficient potencies against multiple targets in tumor cells without excessive toxicity from cross-reactivity with normal tissues.

Focal adhesion kinase (FAK) and Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) belong to the most attractive tyrosine kinase targets for cancer chemotherapy and their role in signal transduction and the cancer development has been well described (for a recent review of FAK and FGFR2 refer to Refs. [4–8]). Much evidence has

\* Corresponding authors. Address: CNRS, UMR8601, Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, Université Paris Descartes, PRES Sorbonne Paris Cité, UFR Biomédicale, 45 rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cedex 06, France. Tel.: +33 142 864 085; fax: +33 142 864 082.

E-mail address: [huixiong.chen@parisdescartes.fr](mailto:huixiong.chen@parisdescartes.fr) (H. Chen).





**ARTICLE N°8:**

**Les cellules pDC : un nouvel eldorado pour la médecine**

Smith N and Herbeuval JP.

**Manuscrit publié dans CNRS, le Journal Online, Journal du CNRS Trimestriel et sur le site de l'Ambassade de France à Mexico**

**ARTICLE N°9:**

**Reduction of death receptor 5 expression and apoptosis of CD4+ T cells from HIV controllers**

Barblu L\*, Smith N\*, Durand S, Scott-Algara D, Boufassa F, Delfraissy JF, Cimarelli A, Lambotte O, Herbeuval JP.

**Manuscrit publié dans Clinical Immunology**

**ARTICLE N°10:**

**Dengue Virus Activates Membrane TRAIL Relocalization and IFN $\alpha$  Production by Human Plasmacytoid Dendritic Cells *In Vitro* and *In Vivo***

Gandini M, Gras C, Leal Azeredo E, de Oliveira Pinto LM, Smith N, Despres P, da Cunha RV, de Souza LJ, Kubelka CF\*, Herbeuval JP\*.

**Manuscrit publié dans PLOS Neglected Tropical Diseases**

**ARTICLE N°11:**

**TRAIL protein localization in human primary T cells by 3D microscopy using 3D interactive surface plot : A new method to visualize plasma membrane**

Gras C, Smith N, Sengmanivong L, Gandini M, Kubelka CF, Herbeuval JP.

**Manuscrit publié dans Journal of Immunological Methods**

**ARTICLE N°12:**

**Characteristics of Plasmacytoid Dendritic Cell and CD4+ T Cell in HIV Elite Controllers**

Herbeuval JP, Smith N, Thèze J.

**Manuscrit publié dans Clinical and Developmental Immunology**



# Les cellules pDC : un nouvel eldorado pour la médecine

YVHRT 

**Biologie.** La découverte récente des cellules dendritiques plasmacytoïdes, dites pDC, pourrait révolutionner un jour la prise en charge de différentes maladies graves.

PAR KHEDIA BETTAÏE

Voilà encore quinze ans, l'existence même des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) était complètement ignorée des biologistes. Désormais, ces entités invisibles à l'œil nu mobilisent pas moins d'une dizaine d'équipes du CNRS œuvrant aussi bien à l'hôpital Necker qu'à l'Institut Pasteur ou à l'université Paris-Descartes. Les enjeux pour la médecine de demain sont énormes.

## De précieuses sentinelles de l'immunité

Véritables sentinelles de l'immunité, les pDC interviennent en première ligne lors d'une infection. Elles patrouillent un peu partout dans notre corps via le sang. Et, dès qu'elles détectent un virus ou une bactérie (via des molécules spéciales à leur surface : les récepteurs Toll-Like), elles déversent dans le sang de très grandes quantités d'une molécule antivirale très puissante : l'interféron (IFN). Vital, l'IFN contribue à inhiber la prolifération des microbes dans les cellules.

Selon le Suisse Rolf Zinkernagel, Prix Nobel de médecine en 1996, sans IFN, nous mourrions de la grippe en

48 heures ! Or les pDC produisent jusqu'à 1 000 fois plus d'IFN que les autres cellules libérant aussi cette substance (macrophages, monocytes...). De plus, elles possèdent une autre arme redoutable à leur surface : la molécule tueuse Trail. Laquelle induit la mort des cellules tumorales ou infectées, mais aussi celle des cellules saines dans le cas de maladies auto-immunes ou du sida.

Vues au microscope, les précieuses pDC ressemblent à des cellules plus connues : les globules

blancs plasmocytes, d'où le terme plasmacytoïdes. En effet, lorsqu'elles ne sont pas activées, elles sont rondes et grosses (de 8 à 10 micromètres de diamètre), comme ces cellules. Les pDC sont très rares, représentant moins de 0,5 % des globules blancs totaux du sang, ce qui les rend difficiles à détecter et à étudier. Pour les découvrir, il a fallu attendre la fin des années 1990, lorsque l'équipe américaine de Frederick Siegal a enfin mis le doigt dessus lors de travaux menés sur les amygdales.

## Plus de 10 000 publications sur le sujet

Depuis, la recherche sur ces cellules a littéralement explosé. Et ce dans différents domaines : virologie, cancérologie, immunologie, etc. « La découverte des pDC a révolutionné la connaissance et la recherche sur l'immunité, s'enthousiasme Jean-Philippe Herbeuval, du Laboratoire de chimie et biochimie pharmacologiques et toxicologiques<sup>1</sup>. On compte aujourd'hui plus de 10 000 publications sur le sujet, ce qui est énorme pour un seul sous-type de cellules découvert récemment. »

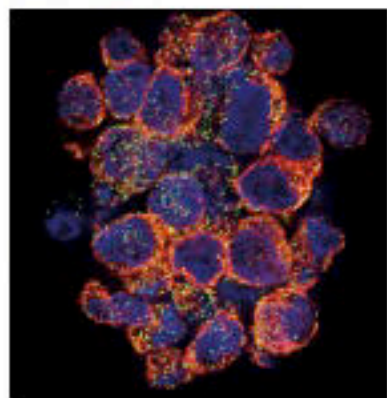
À mesure que les travaux se sont accumulés, il est apparu que les pDC intervenaient non seulement dans les infections classiques contre les virus et les bactéries, mais aussi dans le sida, le cancer et les maladies auto-immunes (sclérose en plaques, lupus...). « Dans certaines maladies (cancer, virus de la dengue, hépatite C), les pDC ont un effet bénéfique ; dans d'autres (sclérose en plaques, VIH), elles sont délétères », résume Jean-Philippe Herbeuval.

## Une piste pour le traitement de maladies graves

Dans le cas du virus du sida, le VIH, les pDC semblent avoir une activité à double tranchant selon le stade de l'infection. Lors de la phase de primo-infection (entre trois et six semaines après la contamination), elles ont un effet bénéfique en limitant la prolifération du VIH. Par contre, lors de la phase chronique de la maladie, elles auraient, d'après Jean-Philippe Herbeuval, « un rôle plus complexe, probablement délétère » : en activant de façon chronique notre immunité, elles induiraient la mort de cellules clés de l'immunité, les CD4+, ce qui déboucherait sur l'apparition de symptômes du sida.

Désormais, l'un des buts majeurs de la recherche est de mettre au point des médicaments capables de moduler l'activité des précieuses pDC. « Si l'on arrive à leur faire produire plus d'IFN, cela ouvrira de nouvelles perspectives pour traiter les cancers », illustre Jean-Philippe Herbeuval. Un énorme défi pour les dix prochaines années. ■

▲ Vue au microscope de cellules pDC cultivées en présence du virus du VIH (points verts).



1. Unité CNRS/Univ. Paris-Descartes. PHOTO M. SMITH/J.P. HERBEUVAL/CNRS





available at www.sciencedirect.com

Clinical Immunology

www.elsevier.com/locate/yclim



# Reduction of death receptor 5 expression and apoptosis of CD4<sup>+</sup> T cells from HIV controllers



Lucie Barblu<sup>a,1</sup>, Nikaïa Smith<sup>b,1</sup>, Stéphanie Durand<sup>c</sup>, Daniel Scott-Algara<sup>d</sup>, Faroudy Boufassa<sup>e</sup>, Jean-François Delfraissy<sup>f,g,h</sup>, Andrea Cimarelli<sup>c</sup>, Olivier Lambotte<sup>f,g,h,1</sup>, Jean-Philippe Herbeuval<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> CNRS UMR 8147; Université Paris Descartes, Paris, France

<sup>b</sup> CNRS UMR 8601, Faculté des Saints-Pères, Université Paris Descartes, Paris, France

<sup>c</sup> Department of Human Virology, Ecole Normale Supérieure de Lyon; INSERM, U758; Université Lyon1, France

<sup>d</sup> Unité de régulation des infections virales, Institut Pasteur, Paris, France

<sup>e</sup> INSERM U1018, Bicêtre, Paris, France

<sup>f</sup> INSERM, U1012, Bicêtre, Paris, France

<sup>g</sup> AP-HP, Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, Bicêtre Hospital, Bicêtre, Paris, France

<sup>h</sup> Université Paris-Sud, Bicêtre, France

Received 30 May 2014; accepted with revision 30 July 2014

Available online 7 August 2014

## KEY WORDS

HIV infected controllers;  
DR5;  
TRAIL;  
Apoptosis;  
CD4<sup>+</sup> T cell

**Abstract** TNF-related apoptosis ligand (TRAIL) induces apoptosis of HIV-1-exposed CD4 T cells expressing the death receptor 5 (DR5) in vitro and has been associated with reduced CD4 T cell number in viremic HIV-1-infected patients. Alterations of the TRAIL/DR5 apoptotic pathway could be involved in the absence of massive CD4 T cell depletion in HIV-1-infected controllers (HIC). We studied here apoptosis of CD4 T cells from HIV-infected progressors and controllers. Reduced apoptosis of CD4 T cells from HIC was observed upon HIV stimulation. This lower apoptosis correlated with a deficiency of DR5 cell surface expression by CD4 T cells upon HIV-1 stimulation. The significant lower apoptosis observed in CD4 T cells after HIV exposure, associated with lower expression of membrane DR5 could explain the better survival of HIV-specific CD4 T cells from HIV controllers. The levels of DR5 cell surface expression on CD4 T cells could represent a new prognostic marker.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Abbreviations:** (HIC), HIV-1 infected controllers; (IFN- $\alpha$ ), interferon alpha; (pDC), plasmacytoid dendritic cell; (TRAIL), TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand; (DR5), Death Receptor 5.

\* Corresponding author at: CNRS – UMR8601, Université Paris Descartes, Faculté des Saints-Pères, 45 rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France. Fax: +33 1 42 86 83 83.

E-mail address: [jean-philippe.herbeuval@parisdescartes.fr](mailto:jean-philippe.herbeuval@parisdescartes.fr) (J.-P. Herbeuval).

<sup>1</sup> Authors contributed equally to the work.





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Journal of Immunological Methods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jim](http://www.elsevier.com/locate/jim)

## Research paper

## TRAIL protein localization in human primary T cells by 3D microscopy using 3D interactive surface plot: A new method to visualize plasma membrane

Christophe Gras<sup>a</sup>, Nikaïa Smith<sup>b</sup>, Lucie Sengmanivong<sup>c</sup>, Mariana Gandini<sup>d</sup>,  
Claire Fernandes Kubelka<sup>d</sup>, Jean-Philippe Herbeuval<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> CNRS UMR 8147, Université Paris Descartes, Paris, France<sup>b</sup> CNRS UMR 8601, Université Paris Descartes, Paris, France<sup>c</sup> Cell and Tissue Imaging Core Facility (PICT-IBiSA) and Nikon Imaging Centre@Institut Curie-CNRS, UMR144, Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, France<sup>d</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Imunologia Viral, Rio de Janeiro, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 10 February 2012

Received in revised form 7 September 2012

Accepted 12 October 2012

Available online 22 October 2012

## Keywords:

TRAIL

CD4 T cell

3D microscopy

ImageJ

## ABSTRACT

The apoptotic ligand TNF-related apoptosis ligand (TRAIL) is expressed on the membrane of immune cells during HIV infection. The intracellular stockade of TRAIL in human primary CD4<sup>+</sup> T cells is not known.

Here we investigated whether primary CD4<sup>+</sup> T cells expressed TRAIL in their intracellular compartment and whether TRAIL is relocalized on the plasma membrane under HIV activation. We found that TRAIL protein was stocked in intracellular compartment in non activated CD4<sup>+</sup> T cells and that the total level of TRAIL protein was not increased under HIV-1 stimulation. However, TRAIL was massively relocalized on plasma membrane when cells were cultured with HIV. Using three dimensional (3D) microscopy we localized TRAIL protein in human T cells and developed a new method to visualize plasma membrane without the need of a membrane marker. This method used the 3D interactive surface plot and bright light acquired images.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The TNF-related apoptosis ligand (TRAIL, Apo2L, TNFSF10, CD253), a TNF- $\alpha$  family member (Wiley et al., 1995), is an apoptotic ligand that induces cell death by binding to its two death receptors DR4 (TRAIL-R1, TNFRSF10A) and DR5 (TRAIL-R2, Apo2, TNFRSF10B, Trick2, TRANCE-R, CD262) (Sheridan et al., 1997; Wu et al., 1997). The two biologically active forms of TRAIL, membrane-bound (mTRAIL) and soluble TRAIL (sTRAIL), are regulated by type I interferon (Sato et al., 2001; Ehrlich et al.,

2003; Tecchio et al., 2004). mTRAIL is expressed by leukocytes, including T lymphocytes (Kayagaki et al., 1999), natural killer cells (Smyth et al., 2001), dendritic cells (Vidalain et al., 2000), B cells, monocytes (Ehrlich et al., 2003) and macrophages (Herbeuval et al., 2003). TRAIL had been extensively studied in oncology (Ashkenazi and Herbst, 2008), due to its property to induce apoptosis of a wide range of tumor cells (Griffith and Lynch, 1998). However, TRAIL localization into immune cells remained poorly documented. We recently demonstrated that plasmacytoid dendritic cells intracellularly stocked TRAIL. Under HTLV-1 stimulation, intracellular TRAIL is rapidly relocalized on plasma membrane transforming pDC into killer cells (IKpDC) (Colisson et al., 2010).

TRAIL may also play a role during HIV-1 infection and progression to AIDS. Indeed, HIV-1 infected patients exhibit higher serum levels of soluble TRAIL than non-infected healthy controls, and TRAIL levels correlate with HIV-1 viral load (Herbeuval et al., 2005a). TRAIL is one of

*Abbreviations:* 3D, three-dimensional; pDC, plasmacytoid dendritic cell; CD4<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup> T lymphocytes; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand; DR5, death receptor 5.

\* Corresponding author at: UMR CNRS 8147, Université Paris Descartes, Hôpital Necker, 149-161 rue de Sèvres, 75743 Paris, CEDEX 15, France. Tel.: +33 144 49 53 87; fax: +33 144 49 06 76.

E-mail address: [jean-philippe.herbeuval@parisdescartes.fr](mailto:jean-philippe.herbeuval@parisdescartes.fr) (J.-P. Herbeuval).





# Dengue Virus Activates Membrane TRAIL Relocalization and IFN- $\alpha$ Production by Human Plasmacytoid Dendritic Cells In Vitro and In Vivo

Mariana Gandini<sup>1</sup>, Christophe Gras<sup>2</sup>, Elzinandes Leal Azeredo<sup>1</sup>, Luzia Maria de Oliveira Pinto<sup>1</sup>, Nikaia Smith<sup>3</sup>, Philippe Despres<sup>4</sup>, Rivaldo Venâncio da Cunha<sup>5</sup>, Luiz José de Souza<sup>6</sup>, Claire Fernandes Kubelka<sup>1,9</sup>, Jean-Philippe Herbeuval<sup>3,9\*</sup>

**1** Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, **2** CNRS UMR 8147, Université Paris Descartes, Paris, France, **3** Chimie et Biologie, Nucléo(s)tidés et Immunologie Thérapeutique (CBNIT), CNRS UMR 8601 Université Paris Descartes, Paris, France, **4** Unité des Interactions moléculaires Flavivirus-Hôtes, Institut Pasteur, Paris, France, **5** Departamento de Clínica Médica, FM, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil, **6** Centro de Referência em Dengue, Campos de Goytacases, Brazil

## Abstract

**Background:** Dengue displays a broad spectrum of clinical manifestations that may vary from asymptomatic to severe and even fatal features. Plasma leakage/hemorrhages can be caused by a cytokine storm induced by monocytes and dendritic cells during dengue virus (DENV) replication. Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are innate immune cells and in response to virus exposure secrete IFN- $\alpha$  and express membrane TRAIL (mTRAIL). We aimed to characterize pDC activation in dengue patients and their function under DENV-2 stimulation *in vitro*.

**Methods & Findings:** Flow cytometry analysis (FCA) revealed that pDCs of mild dengue patients exhibit significantly higher frequencies of mTRAIL compared to severe cases or healthy controls. Plasma levels of IFN- $\alpha$  and soluble TRAIL are increased in mild compared to severe dengue patients, positively correlating with pDC activation. FCA experiments showed that *in vitro* exposure to DENV-2 induced mTRAIL expression on pDC. Furthermore, three dimension microscopy highlighted that TRAIL was relocalized from intracellular compartment to plasma membrane. Chloroquine treatment inhibited DENV-2-induced mTRAIL relocalization and IFN- $\alpha$  production by pDC. Endosomal viral degradation blockade by chloroquine allowed viral antigens detection inside pDCs. All those data are in favor of endocytosis pathway activation by DENV-2 in pDC. Coculture of pDC/DENV-2-infected monocytes revealed a dramatic decrease of antigen detection by FCA. This viral antigens reduction in monocytes was also observed after exogenous IFN- $\alpha$  treatment. Thus, pDC effect on viral load reduction was mainly dependent on IFN- $\alpha$  production

**Conclusions:** This investigation characterizes, during DENV-2 infection, activation of pDCs *in vivo* and their antiviral role *in vitro*. Thus, we propose TRAIL-expressing pDCs may have an important role in the outcome of disease.

**Citation:** Gandini M, Gras C, Azeredo EL, Pinto LMdO, Smith N, et al. (2013) Dengue Virus Activates Membrane TRAIL Relocalization and IFN- $\alpha$  Production by Human Plasmacytoid Dendritic Cells In Vitro and In Vivo. *PLoS Negl Trop Dis* 7(6): e2257. doi:10.1371/journal.pntd.0002257

**Editor:** Kenji Hirayama, Institute of Tropical Medicine (NEKKEN), Japan

**Received:** October 15, 2012; **Accepted:** April 28, 2013; **Published:** June 6, 2013

**Copyright:** © 2013 Gandini et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was financed by FIOCRUZ/CNRS Agreement, CNPq, FAPERJ, CAPES/COFECUB Program and Agence Nationale de la Recherche sur le Sida. MG is a PhD student financed by CNPq. NS is a PhD student partially financed by COFECUB. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript

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

\* E-mail: jean-philippe.herbeuval@parisdescartes.fr

These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Dengue is the most important arthropod-borne emerging viral disease in tropical countries due to its high morbidity and risk of mortality [1]. For example, in Brazil, dengue is a major public health problem and about two million cases were reported during 2010–2012 [2]. Dengue virus (DENV) is a single-stranded RNA virus belonging to genus *Flavivirus* [3,4]. All DENV serotypes (DENV-1 to -4) may induce a broad spectrum of clinical manifestations from asymptomatic to severe clinical features, characterized by hemorrhagic manifestations and a shock syndrome [5,6,7]. High viral load may cause an exacerbated

cytokine production that plays a key role in the generation of important physiopathological processes [8,9]. Human monocytes/macrophages and dendritic cells are susceptible to viral replication [10,11,12,13] and can release soluble mediators involved in vascular permeability and plasma leakage besides coagulation disorders [14,15,16,17].

Dendritic cells link innate and adaptive immunity and play a key role in shaping effective immune responses. Two major subpopulations are described: myeloid or conventional dendritic cells (cDCs) and plasmacytoid dendritic cells (pDCs) [18,19,20,21]. In contrast to cDCs, pDC are not found in homeostatic tissues but mainly in circulating blood and in lymphoid tissues [21,22,23].



*Review Article***Characteristics of Plasmacytoid Dendritic Cell and CD4+ T Cell in HIV Elite Controllers****Jean-Philippe Herbeuval,<sup>1</sup> Nikaïa Smith,<sup>2</sup> and Jacques Thèze<sup>3</sup>**<sup>1</sup> CNRS UMR 8147 and Hôpital Necker, Université Paris Descartes, 149-161 rue de Sèvres, 75015 Paris, France<sup>2</sup> CNRS UMR 8601, Université Paris Descartes, 45 rue des Saint-Pères, 75006 Paris, France<sup>3</sup> Unité d'Immunologie Humaine, Centre Medical Necker Pasteur, Institut Pasteur, 28 Rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

Correspondence should be addressed to Jean-Philippe Herbeuval, jean-philippe.herbeuval@parisdescartes.fr

Received 21 August 2012; Revised 22 October 2012; Accepted 23 October 2012

Academic Editor: Vicki L. Traina-Dorge

Copyright © 2012 Jean-Philippe Herbeuval et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Despite variability, the majority of HIV-1-infected individuals progress to AIDS characterized by high viral load and massive CD4+ T-cell depletion. However, there is a subset of HIV-1-positive individuals that does not progress and spontaneously maintains an undetectable viral load. This infrequent patient population is defined as HIV-1 controllers (HIV controllers), and represents less than 1% of HIV-1-infected patients. HIV-1-specific CD4+ T cells and the pool of central memory CD4+ T cells are also preserved despite immune activation due to HIV-1 infection. The majority of HIV controllers are also defined by the absence of massive CD4+ T-cell depletion, even after 10 years of infection. However, the mechanisms involved in protection against HIV-1 disease progression have not been elucidated yet. Controllers represent a heterogeneous population; we describe in this paper some common characteristics concerning innate immune response and CD4+ T cells of HIV controllers.

**1. Plasmacytoid Dendritic Cells**

The innate immune system is our first line of defense against invading microorganisms while the adaptive immune system acts as a second line of defense and also affords protection against reexposure to the same pathogen. One of the hallmarks of the innate immune response is the production of the antiviral cytokine type I IFN (IFN- $\alpha$  and  $\beta$ ): these factors inhibit viral replication and spreading [1]. Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are the most potent IFN- $\alpha$ -producing cells [2, 3] and serve as an essential link between innate and adaptive immunity [4].

PDC are cells of hemopoietic origin that are found at steady state in the blood, thymus, and peripheral lymphoid tissues [5]. Early studies described pDCs as being oval shaped with typical plasmacytoid morphology. The ability of plasmacytoid-derived DCs (also named DC2) to induce a Th2 differentiation of naïve CD4+ T cells formed the basis for the concept of type 1 and type 2 DC [5]. The role of these

DC in mouse and human was studied in different models and is not completely elucidated [6]. A little later, it was shown that pDC were specialized in the production of type I IFN [2]. They are the principal source of type I IFN in human blood and very rapidly produce all type I IFN isoforms in response to microbial stimuli, such as virus [2, 7], CpG-containing oligonucleotides [8], or the synthetic molecules imidazoquinolines [9]. PDC-derived type I IFN has direct antiviral activity against a variety of viruses, including HIV, and has important adjuvant functions on other immune cell types, such as NK cells, T cells, macrophages and DC [10, 11]. Thus, pDC activation triggers a dual type of response: type I IFN production and DC differentiation [5, 12].

PDCs express the Toll-like receptors TLR7 and TLR9 [13, 14] and respond to their respective ligands, imidazoquinolines [15] and single-strand RNA [16–18] for TLR7, CpG-containing oligonucleotides [19] and DNA viruses [20] for TLR9. They do not express TLR2, TLR3, and TLR4



# **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



- Abt, M.C., Osborne, L.C., Monticelli, L.A., Doering, T.A., Alenghat, T., Sonnenberg, G.F., Paley, M.A., Antenus, M., Williams, K.L., Erikson, J., et al. (2012). Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity. *Immunity* 37, 158-170.
- Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3, 745-756.
- Akira, S. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Adv Immunol* 78, 1-56.
- Akira, S. (2006). TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 311, 1-16.
- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4, 499-511.
- Alexandre, Y.O., Cocita, C.D., Ghilas, S., and Dalod, M. (2014). Deciphering the role of DC subsets in MCMV infection to better understand immune protection against viral infections. *Frontiers in microbiology* 5, 378.
- Almasan, A., and Ashkenazi, A. (2003). Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 337-348.
- Anandhakumar, C., Lavanya, V., Pradheepa, G., Tirumurugaan, K.G., Raj, G.D., Raja, A., Pazhanivel, N., and Balachandran, C. (2012). Expression profile of toll-like receptor 2 mRNA in selected tissues of shark (*Chiloscyllium* sp.). *Fish & shellfish immunology* 33, 1174-1182.
- Arthur, L.O., Bess, J.W., Jr., Chertova, E.N., Rossio, J.L., Esser, M.T., Benveniste, R.E., Henderson, L.E., and Lifson, J.D. (1998). Chemical inactivation of retroviral infectivity by targeting nucleocapsid protein zinc fingers: a candidate SIV vaccine. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14 Suppl 3, S311-319.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
- Asokan, R., Hua, J., Young, K.A., Gould, H.J., Hannan, J.P., Kraus, D.M., Szakonyi, G., Grundy, G.J., Chen, X.S., Crow, M.K., and Holers, V.M. (2006). Characterization of human complement receptor type 2 (CR2/CD21) as a receptor for IFN-alpha: a potential role in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 177, 383-394.
- Aspord, C., Leccia, M.T., Charles, J., and Plumas, J. (2013). Plasmacytoid dendritic cells support melanoma progression by promoting Th2 and regulatory immunity through OX40L and ICOSL. *Cancer immunology research* 1, 402-415.
- Baetu, T.M., and Hiscott, J. (2002). On the TRAIL to apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 199-207.
- Bagnoli, M., Canevari, S., and Mezzanzanica, D. (2010). Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42, 210-213.
- Balabanian, K., Lagane, B., Pablos, J.L., Laurent, L., Planchenault, T., Verola, O., Lebbe, C., Kerob, D., Dupuy, A., Hermine, O., et al. (2005). WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood* 105, 2449-2457.
- Balzarolo, M., Karrich, J.J., Engels, S., Blom, B., Medema, J.P., and Wolkers, M.C. (2012). The transcriptional regulator NAB2 reveals a two-step induction of TRAIL in activated plasmacytoid DCs. *Eur J Immunol* 42, 3019-3027.
- Bamberg, E., Weiser, M., and Desser, H. (1975). Polyamines in bovine epididymal spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility* 45, 363-365.
- Banchereau, J., and Pascual, V. (2006). Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* 25, 383-392.
- Barrat, F.J., Meeker, T., Gregorio, J., Chan, J.H., Uematsu, S., Akira, S., Chang, B., Duramad, O., and Coffman, R.L. (2005). Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 202, 1131-1139.
- Barton, G.M., Kagan, J.C., and Medzhitov, R. (2006). Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* 7, 49-56.
- Bauer, S., Kirschning, C.J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., and Lipford, G.B. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9237-9242.



- Beignon, A.S., McKenna, K., Skoberne, M., Manches, O., Dasilva, I., Kavanagh, D.G., Larsson, M., Gorelick, R.J., Lifson, J.D., and Bhardwaj, N. (2005). Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor- viral RNA interactions. *J Clin Invest*.
- Bell, J.K., Botos, I., Hall, P.R., Askins, J., Shiloach, J., Segal, D.M., and Davies, D.R. (2005). The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 10976-10980.
- Benlahrech, A., and Patterson, S. (2011). HIV-1 infection and induction of interferon alpha in plasmacytoid dendritic cells. *Curr Opin HIV AIDS* *6*, 373-378.
- Benovic, J.L., DeBlasi, A., Stone, W.C., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1989). Beta-adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. *Science* *246*, 235-240.
- Bianchi, M.E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* *81*, 1-5.
- Bidwell, B.N., Slaney, C.Y., Withana, N.P., Forster, S., Cao, Y., Loi, S., Andrews, D., Mikeska, T., Mangan, N.E., Samarajiva, S.A., et al. (2012). Silencing of *Irf7* pathways in breast cancer cells promotes bone metastasis through immune escape. *Nat Med* *18*, 1224-1231.
- Blasius, A.L., Cella, M., Maldonado, J., Takai, T., and Colonna, M. (2006a). Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAPI2. *Blood* *107*, 2474-2476.
- Blasius, A.L., Giurisato, E., Cella, M., Schreiber, R.D., Shaw, A.S., and Colonna, M. (2006b). Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation. *J Immunol* *177*, 3260-3265.
- Blomberg, S., Eloranta, M.L., Magnusson, M., Alm, G.V., and Ronnblom, L. (2003). Expression of the markers BDCA-2 and BDCA-4 and production of interferon-alpha by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* *48*, 2524-2532.
- Blum, A., Chaperot, L., Molens, J.P., Foissaud, V., Plantaz, D., and Plumas, J. (2006). Mechanisms of TRAIL-induced apoptosis in leukemic plasmacytoid dendritic cells. *Exp Hematol* *34*, 1655-1662.
- Boasso, A., Herbeuval, J.P., Hardy, A.W., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Fuchs, D., and Shearer, G.M. (2007a). HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood* *109*, 3351-3359.
- Boasso, A., Vaccari, M., Hryniewicz, A., Fuchs, D., Nacsá, J., Cecchinato, V., Andersson, J., Franchini, G., Shearer, G.M., and Chougnat, C. (2007b). 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.
- Bodmer, J.L., Meier, P., Tschopp, J., and Schneider, P. (2000). Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* *275*, 20632-20637.
- Bodmer, J.L., Schneider, P., and Tschopp, J. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in biochemical sciences* *27*, 19-26.
- Bogdan, C., Mattner, J., and Schleicher, U. (2004). The role of type I interferons in non-viral infections. *Immunol Rev* *202*, 33-48.
- Boonstra, A., Asselin-Paturel, C., Gilliet, M., Crain, C., Trinchieri, G., Liu, Y.J., and O'Garra, A. (2003). Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med* *197*, 101-109.
- Boor, P.P., Metselaar, H.J., Mancham, S., Tilanus, H.W., Kusters, J.G., and Kwekkeboom, J. (2006). Prednisolone suppresses the function and promotes apoptosis of plasmacytoid dendritic cells. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* *6*, 2332-2341.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S., and Lacey, D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* *423*, 337-342.
- Brelot, A., Heveker, N., Montes, M., and Alizon, M. (2000). Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities. *J Biol Chem* *275*, 23736-23744.

- Brinkmann, M.M., Spooner, E., Hoebe, K., Beutler, B., Ploegh, H.L., and Kim, Y.M. (2007). The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J Cell Biol* 177, 265-275.
- Broker, L.E., Kruyt, F.A., and Giaccone, G. (2005). Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 11, 3155-3162.
- Bronson, P.G., Chaivorapol, C., Ortmann, W., Behrens, T.W., and Graham, R.R. (2012). The genetics of type I interferon in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol* 24, 530-537.
- Broxmeyer, H.E., Orschell, C.M., Clapp, D.W., Hangoc, G., Cooper, S., Plett, P.A., Liles, W.C., Li, X., Graham-Evans, B., Campbell, T.B., et al. (2005). Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med* 201, 1307-1318.
- Bruni, D., Chazal, M., Sinigaglia, L., Chauveau, L., Schwartz, O., Despres, P., and Jouvenet, N. (2015). Viral entry route determines how human plasmacytoid dendritic cells produce type I interferons. *Science signaling* 8, ra25.
- Bufe, A., Gehlhar, K., Grage-Griebenow, E., and Ernst, M. (2002). Atopic phenotype in children is associated with decreased virus-induced interferon-alpha release. *Int Arch Allergy Immunol* 127, 82-88.
- Burdette, D.L., and Vance, R.E. (2013). STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nat Immunol* 14, 19-26.
- Busillo, J.M., Armando, S., Sengupta, R., Meucci, O., Bouvier, M., and Benovic, J.L. (2010). Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J Biol Chem* 285, 7805-7817.
- Cao, W., and Bover, L. (2010). Signaling and ligand interaction of ILT7: receptor-mediated regulatory mechanisms for plasmacytoid dendritic cells. *Immunol Rev* 234, 163-176.
- Cao, W., Bover, L., Cho, M., Wen, X., Hanabuchi, S., Bao, M., Rosen, D.B., Wang, Y.H., Shaw, J.L., Du, Q., et al. (2009). Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction. *J Exp Med* 206, 1603-1614.
- Cao, W., Manicassamy, S., Tang, H., Kasturi, S.P., Pirani, A., Murthy, N., and Pulendran, B. (2008). Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)K-mTOR-p70S6K pathway. *Nat Immunol* 9, 1157-1164.
- Cao, W., Rosen, D.B., Ito, T., Bover, L., Bao, M., Watanabe, G., Yao, Z., Zhang, L., Lanier, L.L., and Liu, Y.J. (2006). Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *J Exp Med* 203, 1399-1405.
- Cao, W., Zhang, L., Rosen, D.B., Bover, L., Watanabe, G., Bao, M., Lanier, L.L., and Liu, Y.J. (2007). BDCA2/Fc epsilonRI gamma complex signals through a novel BCR-like pathway in human plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Biol* 5, e248.
- Caron, G., Delneste, Y., Roelandts, E., Duez, C., Herbault, N., Magistrelli, G., Bonnefoy, J.Y., Pestel, J., and Jeannin, P. (2001). Histamine induces CD86 expression and chemokine production by human immature dendritic cells. *J Immunol* 166, 6000-6006.
- Casella, C.R., and Finkel, T.H. (1997). Mechanisms of lymphocyte killing by HIV. *Current opinion in hematology* 4, 24-31.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5, 919-923.
- Cha, S.S., Kim, M.S., Choi, Y.H., Sung, B.J., Shin, N.K., Shin, H.C., Sung, Y.C., and Oh, B.H. (1999a). 2.8 A resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity. *Immunity* 11, 253-261.
- Cha, S.S., Shin, H.C., Choi, K.Y., and Oh, B.H. (1999b). Expression, purification and crystallization of recombinant human TRAIL. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 55, 1101-1104.

- Chan, C.W., Crafton, E., Fan, H.N., Flook, J., Yoshimura, K., Skarica, M., Brockstedt, D., Dubensky, T.W., Stins, M.F., Lanier, L.L., et al. (2006). Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* 12, 207-213.
- Chaperot, L., Blum, A., Manches, O., Lui, G., Angel, J., Molens, J.P., and Plumas, J. (2006). Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 176, 248-255.
- Chattergoon, M.A., Latanich, R., Quinn, J., Winter, M.E., Buckheit, R.W., 3rd, Blankson, J.N., Pardoll, D., and Cox, A.L. (2014). HIV and HCV activate the inflammasome in monocytes and macrophages via endosomal Toll-like receptors without induction of type I interferon. *PLoS Pathog* 10, e1004082.
- Chawla-Sarkar, M., Lindner, D.J., Liu, Y.F., Williams, B.R., Sen, G.C., Silverman, R.H., and Borden, E.C. (2003). Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* 8, 237-249.
- Chen, H., Sun, H., You, F., Sun, W., Zhou, X., Chen, L., Yang, J., Wang, Y., Tang, H., Guan, Y., et al. (2011). Activation of STAT6 by STING is critical for antiviral innate immunity. *Cell* 147, 436-446.
- Cheng, Z.J., Zhao, J., Sun, Y., Hu, W., Wu, Y.L., Cen, B., Wu, G.X., and Pei, G. (2000). beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. *J Biol Chem* 275, 2479-2485.
- Chinnathambi, S., Chen, S., Ganesan, S., and Hanagata, N. (2012). Binding mode of CpG oligodeoxynucleotides to nanoparticles regulates bifurcated cytokine induction via Toll-like receptor 9. *Scientific reports* 2, 534.
- Chockalingam, A., Brooks, J.C., Cameron, J.L., Blum, L.K., and Leifer, C.A. (2009). TLR9 traffics through the Golgi complex to localize to endolysosomes and respond to CpG DNA. *Immunol Cell Biol* 87, 209-217.
- Choe, J., Kelker, M.S., and Wilson, I.A. (2005). Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* 309, 581-585.
- Choi, U.Y., Kang, J.S., Hwang, Y.S., and Kim, Y.J. (2015). Oligoadenylate synthase-like (OASL) proteins: dual functions and associations with diseases. *Experimental & molecular medicine* 47, e144.
- Chow, K.Y., Brotin, E., Ben Khalifa, Y., Carthage, L., Teissier, S., Danckaert, A., Galzi, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Thierry, F., and Bachelier, F. (2010). A pivotal role for CXCL12 signaling in HPV-mediated transformation of keratinocytes: clues to understanding HPV-pathogenesis in WHIM syndrome. *Cell host & microbe* 8, 523-533.
- Ciancanelli, M.J., Huang, S.X., Luthra, P., Garner, H., Itan, Y., Volpi, S., Lafaille, F.G., Trouillet, C., Schmolke, M., Albrecht, R.A., et al. (2015). Infectious disease. Life-threatening influenza and impaired interferon amplification in human IRF7 deficiency. *Science* 348, 448-453.
- Cisse, B., Caton, M.L., Lehner, M., Maeda, T., Scheu, S., Locksley, R., Holmberg, D., Zweier, C., den Hollander, N.S., Kant, S.G., et al. (2008). Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* 135, 37-48.
- Clancy, L., Mruk, K., Archer, K., Woelfel, M., Mongkolsapaya, J., Screaton, G., Lenardo, M.J., and Chan, F.K. (2005). Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18099-18104.
- Clarke, N., Jimenez-Lara, A.M., Voltz, E., and Gronemeyer, H. (2004). Tumor suppressor IRF-1 mediates retinoid and interferon anticancer signaling to death ligand TRAIL. *EMBO J* 23, 3051-3060.
- Coates, P.T., Barratt-Boyes, S.M., Zhang, L., Donnenberg, V.S., O'Connell, P.J., Logar, A.J., Duncan, F.J., Murphey-Corb, M., Donnenberg, A.D., Morelli, A.E., et al. (2003). Dendritic cell subsets in blood and lymphoid tissue of rhesus monkeys and their mobilization with Flt3 ligand. *Blood* 102, 2513-2521.
- Coccia, E.M., Severa, M., Giacomini, E., Monneron, D., Remoli, M.E., Julkunen, I., Cella, M., Lande, R., and Uze, G. (2004). Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression

- of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 34, 796-805.
- Colina, R., Costa-Mattioli, M., Dowling, R.J., Jaramillo, M., Tai, L.H., Breitbach, C.J., Martineau, Y., Larsson, O., Rong, L., Svitkin, Y.V., et al. (2008). Translational control of the innate immune response through IRF-7. *Nature* 452, 323-328.
- Colisson, R., Barblu, L., Gras, C., Raynaud, F., Hadj-Slimane, R., Pique, C., Hermine, O., Lepelletier, Y., and Herbeuval, J.P. (2010). Free HTLV-I induces TLR7-dependent innate immune response and TRAIL relocalization in killer plasmacytoid dendritic cells. *Blood*.
- Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y.J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 5, 1219-1226.
- Contoli, M., Message, S.D., Laza-Stanca, V., Edwards, M.R., Wark, P.A., Bartlett, N.W., Keadze, T., Mallia, P., Stanciu, L.A., Parker, H.L., et al. (2006). Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations. *Nat Med* 12, 1023-1026.
- Cretney, E., Takeda, K., and Smyth, M.J. (2007). Cancer: novel therapeutic strategies that exploit the TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/TRAIL receptor pathway. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 280-286.
- Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J.J., and Smyth, M.J. (2002). Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol* 168, 1356-1361.
- Criscitello, M.F. (2014). What the shark immune system can and cannot provide for the expanding design landscape of immunotherapy. *Expert opinion on drug discovery* 9, 725-739.
- Crow, Y.J. (2015). Type I interferonopathies: mendelian type I interferon up-regulation. *Curr Opin Immunol* 32, 7-12.
- Crozat, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Mann, N., Du, X., Hoebe, K., and Beutler, B. (2006). Analysis of the MCMV resistome by ENU mutagenesis. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 17, 398-406.
- Crozat, K., Vivier, E., and Dalod, M. (2009). Crosstalk between components of the innate immune system: promoting anti-microbial defenses and avoiding immunopathologies. *Immunol Rev* 227, 129-149.
- Cummins, N., and Badley, A. (2009). The TRAIL to viral pathogenesis: the good, the bad and the ugly. *Curr Mol Med* 9, 495-505.
- Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., et al. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10, 942-949.
- Dalod, M., Salazar-Mather, T.P., Malmgaard, L., Lewis, C., Asselin-Paturel, C., Briere, F., Trinchieri, G., and Biron, C.A. (2002). Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med* 195, 517-528.
- Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.
- Davidson, S., Crotta, S., McCabe, T.M., and Wack, A. (2014). Pathogenic potential of interferon alphabeta in acute influenza infection. *Nat Commun* 5, 3864.
- Davidson, S., Maini, M.K., and Wack, A. (2015). Disease-promoting effects of type I interferons in viral, bacterial, and coinfections. *J Interferon Cytokine Res* 35, 252-264.
- Dawicki, W., Jawdat, D.W., Xu, N., and Marshall, J.S. (2010). Mast cells, histamine, and IL-6 regulate the selective influx of dendritic cell subsets into an inflamed lymph node. *J Immunol* 184, 2116-2123.
- Day, T.W., and Safa, A.R. (2009). RNA interference in cancer: targeting the anti-apoptotic protein c-FLIP for drug discovery. *Mini reviews in medicinal chemistry* 9, 741-748.
- Dbouk, H.A., Vadas, O., Shymanets, A., Burke, J.E., Salamon, R.S., Khalil, B.D., Barrett, M.O., Waldo, G.L., Surve, C., Hsueh, C., et al. (2012). G protein-coupled receptor-mediated activation of p110beta by Gbetagamma is required for cellular transformation and invasiveness. *Science signaling* 5, ra89.
- De Clercq, E. (2015). AMD3100/CXCR4 Inhibitor. *Frontiers in immunology* 6, 276.

- de Paus, R.A., van Wengen, A., Schmidt, I., Visser, M., Verdegaal, E.M., van Dissel, J.T., and van de Vosse, E. (2013). Inhibition of the type I immune responses of human monocytes by IFN-alpha and IFN-beta. *Cytokine* 61, 645-655.
- de Ruiter, P.E., Boor, P.P., de Jonge, J., Metselaar, H.J., Tilanus, H.W., Ijzermans, J.N., Kwekkeboom, J., and van der Laan, L.J. (2015). Prednisolone does not affect direct-acting antivirals against hepatitis C, but inhibits interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*.
- Debatin, K.M., and Krammer, P.H. (2004). Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* 23, 2950-2966.
- Debnath, B., Xu, S., Grande, F., Garofalo, A., and Neamati, N. (2013). Small molecule inhibitors of CXCR4. *Theranostics* 3, 47-75.
- Degli-Esposti, M.A., Dougall, W.C., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Smith, C.A., and Goodwin, R.G. (1997a). The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7, 813-820.
- Degli-Esposti, M.A., Smolak, P.J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C.P., DuBose, R.F., Goodwin, R.G., and Smith, C.A. (1997b). Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* 186, 1165-1170.
- Delhaye, S., Paul, S., Blakqori, G., Minet, M., Weber, F., Staeheli, P., and Michiels, T. (2006). Neurons produce type I interferon during viral encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7835-7840.
- Di Pucchio, T., Chatterjee, B., Smed-Sorensen, A., Clayton, S., Palazzo, A., Montes, M., Xue, Y., Mellman, I., Banchereau, J., and Connolly, J.E. (2008). Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat Immunol* 9, 551-557.
- Diamond, M.S., and Farzan, M. (2013). The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nat Rev Immunol* 13, 46-57.
- Diana, J., Brezar, V., Beaudoin, L., Dalod, M., Mellor, A., Tafuri, A., von Herrath, M., Boitard, C., Mallone, R., and Lehuen, A. (2011). Viral infection prevents diabetes by inducing regulatory T cells through NKT cell-plasmacytoid dendritic cell interplay. *J Exp Med* 208, 729-745.
- Diana, J., Griseri, T., Lagaye, S., Beaudoin, L., Autrusseau, E., Gautron, A.S., Tomkiewicz, C., Herbelin, A., Barouki, R., von Herrath, M., et al. (2009). NKT cell-plasmacytoid dendritic cell cooperation via OX40 controls viral infection in a tissue-specific manner. *Immunity* 30, 289-299.
- Dick, A., Graf, L., Olal, D., von der Malsburg, A., Gao, S., Kochs, G., and Daumke, O. (2015). Role of nucleotide binding and GTPase domain dimerization in dynamin-like myxovirus resistance protein A for GTPase activation and antiviral activity. *J Biol Chem* 290, 12779-12792.
- Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529-1531.
- Diehl, G.E., Yue, H.H., Hsieh, K., Kuang, A.A., Ho, M., Morici, L.A., Lenz, L.L., Cado, D., Riley, L.W., and Winoto, A. (2004). TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. *Immunity* 21, 877-889.
- Diop, O.M., Ploquin, M.J., Mortara, L., Faye, A., Jacquelin, B., Kunkel, D., Lebon, P., Butor, C., Hosmalin, A., Barre-Sinoussi, F., and Muller-Trutwin, M.C. (2008). Plasmacytoid dendritic cell dynamics and alpha interferon production during Simian immunodeficiency virus infection with a nonpathogenic outcome. *J Virol* 82, 5145-5152.
- Donzella, G.A., Schols, D., Lin, S.W., Este, J.A., Nagashima, K.A., Maddon, P.J., Allaway, G.P., Sakmar, T.P., Henson, G., De Clercq, E., and Moore, J.P. (1998). AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med* 4, 72-77.
- Downes, G.B., and Gautam, N. (1999). The G protein subunit gene families. *Genomics* 62, 544-552.
- Drobits, B., Holcmann, M., Amberg, N., Swiecki, M., Grundtner, R., Hammer, M., Colonna, M., and Sibilina, M. (2012). Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *J Clin Invest* 122, 575-585.
- Dulek, D.E., Newcomb, D.C., Toki, S., Goliniewska, K., Cephus, J., Reiss, S., Bates, J.T., Crowe, J.E., Jr., Boyd, K.L., Moore, M.L., et al. (2014). STAT4 deficiency fails to induce lung Th2 or Th17 immunity

- following primary or secondary respiratory syncytial virus (RSV) challenge but enhances the lung RSV-specific CD8<sup>+</sup> T cell immune response to secondary challenge. *J Virol* 88, 9655-9672.
- Dumitriu, I.E., Baruah, P., Bianchi, M.E., Manfredi, A.A., and Rovere-Querini, P. (2005). Requirement of HMGB1 and RAGE for the maturation of human plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 35, 2184-2190.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Sheehan, K.C., Shankaran, V., Uppaluri, R., Bui, J.D., Diamond, M.S., Koebel, C.M., Arthur, C., White, J.M., and Schreiber, R.D. (2005). A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunol* 6, 722-729.
- Duramad, O., Fearon, K.L., Chang, B., Chan, J.H., Gregorio, J., Coffman, R.L., and Barrat, F.J. (2005). Inhibitors of TLR-9 act on multiple cell subsets in mouse and man in vitro and prevent death in vivo from systemic inflammation. *J Immunol* 174, 5193-5200.
- Dzionek, A., Inagaki, Y., Okawa, K., Nagafune, J., Rock, J., Sohma, Y., Winkels, G., Zysk, M., Yamaguchi, Y., and Schmitz, J. (2002). Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol* 63, 1133-1148.
- Dzionek, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Gunther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., et al. (2001). BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med* 194, 1823-1834.
- Eberle, F., Sirin, M., Binder, M., and Dalpke, A.H. (2009). Bacterial RNA is recognized by different sets of immunoreceptors. *Eur J Immunol* 39, 2537-2547.
- Ehrlich, S., Infante-Duarte, C., Seeger, B., and Zipp, F. (2003). Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes. *Cytokine* 24, 244-253.
- Eimon, P.M., Kratz, E., Varfolomeev, E., Hymowitz, S.G., Stern, H., Zha, J., and Ashkenazi, A. (2006). Delineation of the cell-extrinsic apoptosis pathway in the zebrafish. *Cell Death Differ* 13, 1619-1630.
- Emery, J.G., McDonnell, P., Burke, M.B., Deen, K.C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E.R., Eichman, C., DiPrinzio, R., et al. (1998). Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 273, 14363-14367.
- Evinger, M., Maeda, S., and Pestka, S. (1981). Recombinant human leukocyte interferon produced in bacteria has antiproliferative activity. *J Biol Chem* 256, 2113-2114.
- Evinger, M., and Pestka, S. (1981). Assay of growth inhibition in lymphoblastoid cell cultures. *Methods in enzymology* 79, 362-368.
- Ewald, S.E., Lee, B.L., Lau, L., Wickliffe, K.E., Shi, G.P., Chapman, H.A., and Barton, G.M. (2008). The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* 456, 658-662.
- Facchetti, F., de Wolf-Peeters, C., Mason, D.Y., Pulford, K., van den Oord, J.J., and Desmet, V.J. (1988). Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin. *Am J Pathol* 133, 15-21.
- Facchetti, F., and Vergoni, F. (2000). The plasmacytoid monocyte: from morphology to function. *Advances in clinical pathology : the official journal of Adriatic Society of Pathology* 4, 187-190.
- Facchetti, F., Vermi, W., Mason, D., and Colonna, M. (2003). The plasmacytoid monocyte/interferon producing cells. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 443, 703-717.
- Fadeel, B., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (1999). Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochem Biophys Res Commun* 266, 699-717.
- Falschlehner, C., Schaefer, U., and Walczak, H. (2009). Following TRAIL's path in the immune system. *Immunology* 127, 145-154.
- Fanger, N.A., Maliszewski, C.R., Schooley, K., and Griffith, T.S. (1999). Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Exp Med* 190, 1155-1164.
- Feller, A.C., Parwaresch, M.R., and Lennert, K. (1983). Subtyping of chronic lymphocytic leukemia of T-type by dipeptidylaminopeptidase IV (DAP IV), monoclonal antibodies, and Fc-receptors. *Cancer* 52, 1609-1612.

- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.W., Juliana, C., Solorzano, L., Kang, S., Wu, J., Datta, P., McCormick, M., Huang, L., McDermott, E., *et al.* (2010). The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*. *Nat Immunol* 11, 385-393.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Fitzgerald-Bocarsly, P., and Jacobs, E.S. (2010). Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection: striking a delicate balance. *J Leukoc Biol* 87, 609-620.
- Fonteneau, J.F., Kavanagh, D.G., Lirvall, M., Sanders, C., Cover, T.L., Bhardwaj, N., and Larsson, M. (2003). Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood* 102, 4448-4455.
- Forsbach, A., Muller, C., Montino, C., Kritzler, A., Curdt, R., Benahmed, A., Jurk, M., and Vollmer, J. (2012). Impact of delivery systems on siRNA immune activation and RNA interference. *Immunol Lett* 141, 169-180.
- Forsbach, A., Nemorin, J.G., Montino, C., Muller, C., Samulowitz, U., Vicari, A.P., Jurk, M., Mutwiri, G.K., Krieg, A.M., Lipford, G.B., and Vollmer, J. (2008). Identification of RNA sequence motifs stimulating sequence-specific TLR8-dependent immune responses. *J Immunol* 180, 3729-3738.
- Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99, 23-33.
- Fraietta, J.A., Mueller, Y.M., Yang, G., Boesteanu, A.C., Gracias, D.T., Do, D.H., Hope, J.L., Kathuria, N., McGettigan, S.E., Lewis, M.G., *et al.* (2013). Type I interferon upregulates Bak and contributes to T cell loss during human immunodeficiency virus (HIV) infection. *PLoS Pathog* 9, e1003658.
- Fricker, S.P., Anastassov, V., Cox, J., Darkes, M.C., Grujic, O., Idzan, S.R., Labrecque, J., Lau, G., Mosi, R.M., Nelson, K.L., *et al.* (2006). Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: a specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4. *Biochemical pharmacology* 72, 588-596.
- Fuchs, A., Cella, M., Kondo, T., and Colonna, M. (2005). Paradoxical inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44. *Blood* 106, 2076-2082.
- Fuchs, Y., and Steller, H. (2015). Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 329-344.
- Fucini, R.V., Haringsma, H.J., Deng, P., Flanagan, W.M., and Willingham, A.T. (2012). Adenosine modification may be preferred for reducing siRNA immune stimulation. *Nucleic acid therapeutics* 22, 205-210.
- Fujisawa, J., Iwakura, Y., and Kawade, Y. (1978). Nonglycosylated mouse L cell interferon produced by the action of tunicamycin. *J Biol Chem* 253, 8677-8679.
- Fukao, T., and Koyasu, S. (2003). PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol* 24, 358-363.
- Fung, K.Y., Mangan, N.E., Cumming, H., Horvat, J.C., Mayall, J.R., Stifter, S.A., De Weerd, N., Roisman, L.C., Rossjohn, J., Robertson, S.A., *et al.* (2013). Interferon-epsilon protects the female reproductive tract from viral and bacterial infection. *Science* 339, 1088-1092.
- Gandini, M., Gras, C., Azeredo, E.L., Pinto, L.M., Smith, N., Despres, P., da Cunha, R.V., de Souza, L.J., Kubelka, C.F., and Herbeuval, J.P. (2013). Dengue Virus Activates Membrane TRAIL Relocalization and IFN-alpha Production by Human Plasmacytoid Dendritic Cells In Vitro and In Vivo. *PLoS neglected tropical diseases* 7, e2257.
- Gaur, U., and Aggarwal, B.B. (2003). Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochemical pharmacology* 66, 1403-1408.
- Geijtenbeek, T.B., and Gringhuis, S.I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* 9, 465-479.
- Gelman, A.E., LaRosa, D.F., Zhang, J., Walsh, P.T., Choi, Y., Sunyer, J.O., and Turka, L.A. (2006). The adaptor molecule MyD88 activates PI-3 kinase signaling in CD4+ T cells and enables CpG oligodeoxynucleotide-mediated costimulation. *Immunity* 25, 783-793.

- Genin, P., Vaccaro, A., and Civas, A. (2009). The role of differential expression of human interferon- $\alpha$  genes in antiviral immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 20, 283-295.
- Gerlach, L.O., Skerlj, R.T., Bridger, G.J., and Schwartz, T.W. (2001). Molecular interactions of cyclam and bicyclam non-peptide antagonists with the CXCR4 chemokine receptor. *J Biol Chem* 276, 14153-14160.
- GeurtsvanKessel, C.H., and Lambrecht, B.N. (2008). Division of labor between dendritic cell subsets of the lung. *Mucosal immunology* 1, 442-450.
- Gibbert, K., Schlaak, J.F., Yang, D., and Dittmer, U. (2013). IFN- $\alpha$  subtypes: distinct biological activities in anti-viral therapy. *British journal of pharmacology* 168, 1048-1058.
- Gill, M.A., Bajwa, G., George, T.A., Dong, C.C., Dougherty, II, Jiang, N., Gan, V.N., and Gruchalla, R.S. (2010). Counterregulation between the Fc $\epsilon$ RI pathway and antiviral responses in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 184, 5999-6006.
- Gilliet, M., Cao, W., and Liu, Y.J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 8, 594-606.
- Goldstone, D.C., Ennis-Adeniran, V., Hedden, J.J., Groom, H.C., Rice, G.I., Christodoulou, E., Walker, P.A., Kelly, G., Haire, L.F., Yap, M.W., et al. (2011). HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature* 480, 379-382.
- Gonzales-van Horn, S.R., and Farrar, J.D. (2015). Interferon at the crossroads of allergy and viral infections. *J Leukoc Biol* 98, 185-194.
- Gonzalez, F., and Ashkenazi, A. (2010). New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene* 29, 4752-4765.
- Goubau, D., Deddouche, S., and Reis e Sousa, C. (2013). Cytosolic sensing of viruses. *Immunity* 38, 855-869.
- Gougeon, M.L., and Herbeuval, J.P. (2012). IFN- $\alpha$  and TRAIL: a double edge sword in HIV-1 disease? *Exp Cell Res* 318, 1260-1268.
- Gougeon, M.L., Melki, M.T., and Saidi, H. (2012). HMGB1, an alarmin promoting HIV dissemination and latency in dendritic cells. *Cell Death Differ* 19, 96-106.
- Gras, C., Smith, N., Sengmanivong, L., Gandini, M., Kubelka, C.F., and Herbeuval, J.P. (2013). TRAIL protein localization in human primary T cells by 3D microscopy using 3D interactive surface plot: a new method to visualize plasma membrane. *J Immunol Methods* 387, 147-156.
- Gray, H.L., Sorensen, E.L., Hunt, J.S., and Ober, C. (2001). Three polymorphisms in the 3' UTR of the TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) gene. *Genes and immunity* 2, 469-470.
- Griffith, T.S., and Lynch, D.H. (1998). TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr Opin Immunol* 10, 559-563.
- Griffith, T.S., Wiley, S.R., Kubin, M.Z., Sedger, L.M., Maliszewski, C.R., and Fanger, N.A. (1999). Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J Exp Med* 189, 1343-1354.
- Grouard, G., Risoan, M.C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y.J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 185, 1101-1111.
- Gschwandtner, M., Mommert, S., Kother, B., Werfel, T., and Gutzmer, R. (2011). The histamine H4 receptor is highly expressed on plasmacytoid dendritic cells in psoriasis and histamine regulates their cytokine production and migration. *J Invest Dermatol* 131, 1668-1676.
- Gubernator, N.G., Sames, S., Sulzer, D., and Vadola, P. (2008). Fluorescent substrates for monoamine transporters as optical false neurotransmitters. (US).
- Gubernator, N.G., Zhang, H., Staal, R.G., Mosharov, E.V., Pereira, D.B., Yue, M., Balsanek, V., Vadola, P.A., Mukherjee, B., Edwards, R.H., et al. (2009). Fluorescent false neurotransmitters visualize dopamine release from individual presynaptic terminals. *Science* 324, 1441-1444.
- Gugliucci, A., and Menini, T. (2003). The polyamines spermine and spermidine protect proteins from structural and functional damage by AGE precursors: a new role for old molecules? *Life Sci* 72, 2603-2616.
- Guicciardi, M.E., and Gores, G.J. (2009). Life and death by death receptors. *FASEB J* 23, 1625-1637.



- Guiducci, C., Ghirelli, C., Marloie-Provost, M.A., Matray, T., Coffman, R.L., Liu, Y.J., Barrat, F.J., and Soumelis, V. (2008). PI3K is critical for the nuclear translocation of IRF-7 and type I IFN production by human plasmacytoid dendritic cells in response to TLR activation. *J Exp Med* 205, 315-322.
- Guiducci, C., Gong, M., Xu, Z., Gill, M., Chaussabel, D., Meeker, T., Chan, J.H., Wright, T., Punaro, M., Bolland, S., et al. (2010). TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus. *Nature* 465, 937-941.
- Guiducci, C., Ott, G., Chan, J.H., Damon, E., Calacsan, C., Matray, T., Lee, K.D., Coffman, R.L., and Barrat, F.J. (2006). Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *The Journal of experimental medicine* 203, 1999-2008.
- Gurung, P., Rai, D., Condotta, S.A., Babcock, J.C., Badovinac, V.P., and Griffith, T.S. (2011). Immune unresponsiveness to secondary heterologous bacterial infection after sepsis induction is TRAIL dependent. *J Immunol* 187, 2148-2154.
- Guzzo, P.R., and Miller, M.J. (1994). Catalytic, Asymmetric-Synthesis of the Carbacephem Framework. *J Org Chem* 59, 4862-4867.
- Haas, T., Metzger, J., Schmitz, F., Heit, A., Muller, T., Latz, E., and Wagner, H. (2008). The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity* 28, 315-323.
- Hadeiba, H., Lahl, K., Edalati, A., Oderup, C., Habtezion, A., Pachynski, R., Nguyen, L., Ghodsi, A., Adler, S., and Butcher, E.C. (2012). Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity* 36, 438-450.
- Hagberg, N., and Ronnblom, L. (2015). Systemic Lupus Erythematosus - A Disease with A Dysregulated Type I Interferon System. *Scand J Immunol* 82, 199-207.
- Halaas, O., Vik, R., Ashkenazi, A., and Espevik, T. (2000). Lipopolysaccharide induces expression of APO2 ligand/TRAIL in human monocytes and macrophages. *Scand J Immunol* 51, 244-250.
- Han, L.H., Sun, W.S., Ma, C.H., Zhang, L.N., Liu, S.X., Zhang, Q., Gao, L.F., and Chen, Y.H. (2002). Detection of soluble TRAIL in HBV infected patients and its clinical implications. *World journal of gastroenterology : WJG* 8, 1077-1080.
- Handisurya, A., Schellenbacher, C., Reininger, B., Koszik, F., Vyhnanek, P., Heitger, A., Kirnbauer, R., and Forster-Waldl, E. (2010). A quadrivalent HPV vaccine induces humoral and cellular immune responses in WHIM immunodeficiency syndrome. *Vaccine* 28, 4837-4841.
- Hardy, A.W., Graham, D.R., Shearer, G.M., and Herbeuval, J.P. (2007). HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17453-17458.
- Hardy, M.P., Owczarek, C.M., Jermini, L.S., Ejdeback, M., and Hertzog, P.J. (2004). Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes. *Genomics* 84, 331-345.
- Harris, L.D., Tabb, B., Sodora, D.L., Paiardini, M., Klatt, N.R., Douek, D.C., Silvestri, G., Muller-Trutwin, M., Vasile-Pandrea, I., Apetrei, C., et al. (2010). Downregulation of robust acute type I interferon responses distinguishes nonpathogenic simian immunodeficiency virus (SIV) infection of natural hosts from pathogenic SIV infection of rhesus macaques. *J Virol* 84, 7886-7891.
- Hashiguchi, S., Kawada, A., and Natsugari, H. (1992). Bakers-Yeast Reduction of N-Protected Methyl 4-Amino-3-Oxobutanoates and 4-Amino-3-Oxopentanoates. *Synthesis-Stuttgart*, 403-408.
- Hatse, S., Princen, K., Bridger, G., De Clercq, E., and Schols, D. (2002). Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Lett* 527, 255-262.
- Hatse, S., Princen, K., Gerlach, L.O., Bridger, G., Henson, G., De Clercq, E., Schwartz, T.W., and Schols, D. (2001). Mutation of Asp(171) and Asp(262) of the chemokine receptor CXCR4 impairs its coreceptor function for human immunodeficiency virus-1 entry and abrogates the antagonistic activity of AMD3100. *Molecular pharmacology* 60, 164-173.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526-1529.

- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3, 196-200.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.
- Hendrix, C.W., Flexner, C., MacFarland, R.T., Giandomenico, C., Fuchs, E.J., Redpath, E., Bridger, G., and Henson, G.W. (2000). Pharmacokinetics and safety of AMD-3100, a novel antagonist of the CXCR-4 chemokine receptor, in human volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1667-1673.
- Hennessy, E.J., Parker, A.E., and O'Neill, L.A. (2010). Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov* 9, 293-307.
- Herbeuval, J.P., Grivel, J.C., Boasso, A., Hardy, A.W., Chougnet, C., Dolan, M.J., Yagita, H., Lifson, J.D., and Shearer, G.M. (2005a). CD4+ T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type I interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood* 106, 3524-3531.
- Herbeuval, J.P., Hardy, A.W., Boasso, A., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Dy, M., and Shearer, G.M. (2005b). Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand on primary CD4+ T cells by HIV-1: role of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13974-13979.
- Herbeuval, J.P., Lambert, C., Sabido, O., Cottier, M., Fournel, P., Dy, M., and Genin, C. (2003). Macrophages From Cancer Patients: Analysis of TRAIL, TRAIL Receptors, and Colon Tumor Cell Apoptosis. *J Natl Cancer Inst* 95, 611-621.
- Herbeuval, J.P., Nilsson, J., Boasso, A., Hardy, A.W., Kruhlak, M.J., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Dy, M., Andersson, J., and Shearer, G.M. (2006). Differential expression of IFN-alpha and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7000-7005.
- Herbeuval, J.P., and Shearer, G.M. (2007). HIV-1 immunopathogenesis: how good interferon turns bad. *Clin Immunol* 123, 121-128.
- Herbeuval, J.P., Smith, N., and Theze, J. (2012). Characteristics of plasmacytoid dendritic cell and CD4+ T cell in HIV elite controllers. *Clinical & developmental immunology* 2012, 869505.
- Hernandez, P.A., Gorlin, R.J., Lukens, J.N., Taniuchi, S., Bohinjec, J., Francois, F., Klotman, M.E., and Diaz, G.A. (2003). Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet* 34, 70-74.
- Hillyer, P., Mane, V.P., Schramm, L.M., Puig, M., Verthelyi, D., Chen, A., Zhao, Z., Navarro, M.B., Kirschman, K.D., Bykadi, S., et al. (2012). Expression profiles of human interferon-alpha and interferon-lambda subtypes are ligand- and cell-dependent. *Immunol Cell Biol* 90, 774-783.
- Hochrein, H., Schlatter, B., O'Keefe, M., Wagner, C., Schmitz, F., Schiemann, M., Bauer, S., Suter, M., and Wagner, H. (2004). Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11416-11421.
- Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C., and Taniguchi, T. (2005). Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* 434, 1035-1040.
- Honda, K., and Taniguchi, T. (2006). Toll-like receptor signaling and IRF transcription factors. *IUBMB life* 58, 290-295.
- Honda, K., Yanai, H., Mizutani, T., Negishi, H., Shimada, N., Suzuki, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yeh, W.C., and Taniguchi, T. (2004). Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15416-15421.
- Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D.R., Latz, E., and Fitzgerald, K.A. (2009). AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458, 514-518.

- Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougerolles, A., et al. (2005). Sequence-specific potent induction of IFN- $\alpha$  by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11, 263-270.
- Hou, Y.F., Zhou, Y.C., Zheng, X.X., Wang, H.Y., Fu, Y.L., Fang, Z.M., and He, S.H. (2006). Modulation of expression and function of Toll-like receptor 3 in A549 and H292 cells by histamine. *Mol Immunol* 43, 1982-1992.
- Huang, G.J., Edwards, A., Tsai, C.Y., Lee, Y.S., Peng, L., Era, T., Hirabayashi, Y., Tsai, C.Y., Nishikawa, S., Iwakura, Y., et al. (2014). Ectopic cerebellar cell migration causes maldevelopment of Purkinje cells and abnormal motor behaviour in *Cxcr4* null mice. *PLoS One* 9, e86471.
- Hubert, F.X., Voisine, C., Louvet, C., Heslan, M., and Josien, R. (2004). Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD11b-OX62<sup>-</sup> and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *J Immunol* 172, 7485-7494.
- Hymowitz, S.G., Christinger, H.W., Fuh, G., Ultsch, M., O'Connell, M., Kelley, R.F., Ashkenazi, A., and de Vos, A.M. (1999). Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol Cell* 4, 563-571.
- Hymowitz, S.G., O'Connell, M.P., Ultsch, M.H., Hurst, A., Totpal, K., Ashkenazi, A., de Vos, A.M., and Kelley, R.F. (2000). A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry* 39, 633-640.
- Irmiler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., et al. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195.
- Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147, 258-267.
- Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Hori, T., Ota, M., Nakamura, K., Takebayashi, M., Miyaji, M., Yoshimura, T., Inaba, K., and Fukuhara, S. (2004). Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J Immunol* 172, 4253-4259.
- Ito, T., Kanzler, H., Duramad, O., Cao, W., and Liu, Y.J. (2006). Specialization, kinetics, and repertoire of type I interferon responses by human plasmacytoid predendritic cells. *Blood* 107, 2423-2431.
- Ito, T., Yang, M., Wang, Y.H., Lande, R., Gregorio, J., Perng, O.A., Qin, X.F., Liu, Y.J., and Gilliet, M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med* 204, 105-115.
- Ivashkiv, L.B. (2013). PTPN22 in autoimmunity: different cell and different way. *Immunity* 39, 91-93.
- Ivashkiv, L.B., and Donlin, L.T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 14, 36-49.
- Jackson, A.L., Burchard, J., Leake, D., Reynolds, A., Schelter, J., Guo, J., Johnson, J.M., Lim, L., Karpilow, J., Nichols, K., et al. (2006). Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *Rna* 12, 1197-1205.
- Jacquelin, B., Mayau, V., Targat, B., Liovat, A.S., Kunkel, D., Petitjean, G., Dillies, M.A., Roques, P., Butor, C., Silvestri, G., et al. (2009). Nonpathogenic SIV infection of African green monkeys induces a strong but rapidly controlled type I IFN response. *J Clin Invest* 119, 3544-3555.
- Jahns, H., Roos, M., Imig, J., Baumann, F., Wang, Y., Gilmour, R., and Hall, J. (2015). Stereochemical bias introduced during RNA synthesis modulates the activity of phosphorothioate siRNAs. *Nature communications* 6, 6317.
- Jahrsdorfer, B., Vollmer, A., Blackwell, S.E., Maier, J., Sontheimer, K., Beyer, T., Mandel, B., Lunov, O., Tron, K., Nienhaus, G.U., et al. (2010). Granzyme B produced by human plasmacytoid dendritic cells suppresses T-cell expansion. *Blood* 115, 1156-1165.
- Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.

- Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2001). Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 31, 3388-3393.
- Jego, G., Palucka, A.K., Blanck, J.P., Chalouni, C., Pascual, V., and Banchereau, J. (2003). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 19, 225-234.
- Jeremias, I., Herr, I., Boehler, T., and Debatin, K.M. (1998). TRAIL/Apo-2-ligand-induced apoptosis in human T cells. *Eur J Immunol* 28, 143-152.
- Judge, A.D., Bola, G., Lee, A.C., and MacLachlan, I. (2006). Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Mol Ther* 13, 494-505.
- Judge, A.D., Sood, V., Shaw, J.R., Fang, D., McClintock, K., and MacLachlan, I. (2005). Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 23, 457-462.
- Junttila, I.S., Watson, C., Kummola, L., Chen, X., Hu-Li, J., Guo, L., Yagi, R., and Paul, W.E. (2013). Efficient cytokine-induced IL-13 production by mast cells requires both IL-33 and IL-3. *The Journal of allergy and clinical immunology* 132, 704-712 e710.
- Jutel, M., Akdis, M., and Akdis, C.A. (2009). Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin Exp Allergy* 39, 1786-1800.
- Kader, M., Smith, A.P., Guiducci, C., Wonderlich, E.R., Normolle, D., Watkins, S.C., Barrat, F.J., and Barratt-Boyes, S.M. (2013). Blocking TLR7- and TLR9-mediated IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells does not diminish immune activation in early SIV infection. *PLoS Pathog* 9, e1003530.
- Kadowaki, N., Antonenko, S., Lau, J.Y., and Liu, Y.J. (2000). Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 192, 219-226.
- 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.
- Kadowaki, N., and Liu, Y.J. (2002). Natural type I interferon-producing cells as a link between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol* 63, 1126-1132.
- Kang, J.Y., and Lee, J.O. (2011). Structural biology of the Toll-like receptor family. *Annu Rev Biochem* 80, 917-941.
- Kanno, A., Tanimura, N., Ishizaki, M., Ohko, K., Motoi, Y., Onji, M., Fukui, R., Shimozato, T., Yamamoto, K., Shibata, T., et al. (2015). Targeting cell surface TLR7 for therapeutic intervention in autoimmune diseases. *Nature communications* 6, 6119.
- Kariko, K., Buckstein, M., Ni, H., and Weissman, D. (2005). Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* 23, 165-175.
- Kariko, K., and Weissman, D. (2007). Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: implication for therapeutic RNA development. *Current opinion in drug discovery & development* 10, 523-532.
- Karupiah, G., Xie, Q.W., Buller, R.M., Nathan, C., Duarte, C., and MacMicking, J.D. (1993). Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science* 261, 1445-1448.
- Kathmann, M., Schlicker, E., Detzner, M., and Timmerman, H. (1993). Nordimaprit, homodimaprit, clobenpropit and imetit: affinities for H3 binding sites and potencies in a functional H3 receptor model. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 348, 498-503.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., et al. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441, 101-105.
- Kawai, T., Sato, S., Ishii, K.J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., Terai, K., Matsuda, M., Inoue, J., Uematsu, S., et al. (2004). Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nature immunology* 5, 1061-1068.

- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K.J., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 6, 981-988.
- Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nakayama, M., Eto, H., Okumura, K., and Yagita, H. (1999). Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J Exp Med* 189, 1451-1460.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26, 239-257.
- Khosravi-Far, R., and Esposti, M.D. (2004). Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther* 3, 1051-1057.
- Kim, J.M., Park, S.H., Kim, H.Y., and Kwok, S.K. (2015). A Plasmacytoid Dendritic Cells-Type I Interferon Axis Is Critically Implicated in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *International journal of molecular sciences* 16, 14158-14170.
- Kim, T., Pazhoor, S., Bao, M., Zhang, Z., Hanabuchi, S., Facchinetti, V., Bover, L., Plumas, J., Chaperot, L., Qin, J., and Liu, Y.J. (2010). Aspartate-glutamate-alanine-histidine box motif (DEAH)/RNA helicase A helicases sense microbial DNA in human plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15181-15186.
- Kim, Y.M., Brinkmann, M.M., Paquet, M.E., and Ploegh, H.L. (2008). UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 452, 234-238.
- Kirou, K.A., and Gkrouzman, E. (2013). Anti-interferon alpha treatment in SLE. *Clin Immunol* 148, 303-312.
- Kirshner, J.R., Karpova, A.Y., Kops, M., and Howley, P.M. (2005). Identification of TRAIL as an interferon regulatory factor 3 transcriptional target. *J Virol* 79, 9320-9324.
- Kobayashi, K., Inohara, N., Hernandez, L.D., Galan, J.E., Nunez, G., Janeway, C.A., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2002). RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* 416, 194-199.
- Kofuku, Y., Yoshiura, C., Ueda, T., Terasawa, H., Hirai, T., Tominaga, S., Hirose, M., Maeda, Y., Takahashi, H., Terashima, Y., et al. (2009). Structural basis of the interaction between chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 and its G-protein-coupled receptor CXCR4. *The Journal of biological chemistry* 284, 35240-35250.
- Kool, M., Geurtsvankessel, C., Muskens, F., Madeira, F.B., van Nimwegen, M., Kuipers, H., Thielemans, K., Hoogsteden, H.C., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2011). Facilitated antigen uptake and timed exposure to TLR ligands dictate the antigen-presenting potential of plasmacytoid DCs. *J Leukoc Biol* 90, 1177-1190.
- Kotenko, S.V., Gallagher, G., Baurin, V.V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N.K., Langer, J.A., Sheikh, F., Dickensheets, H., and Donnelly, R.P. (2003). IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 4, 69-77.
- Kralj, D., Friedrich, M., Groselj, U., Kiraly-Potpara, S., Meden, A., Waggener, J., Dahmann, G., Stanovnik, B., and Svete, J. (2009). A synthesis of 1-substituted 5-[2-(acylamino)ethyl]-1H-pyrazole-4-carboxamides. *Tetrahedron* 65, 7151-7162.
- Krishnaswamy Gopalan, T., Gururaj, P., Gupta, R., Gopal, D.R., Rajesh, P., Chidambaram, B., Kalyanasundaram, A., and Angamuthu, R. (2014). Transcriptome profiling reveals higher vertebrate orthologous of intra-cytoplasmic pattern recognition receptors in grey bamboo shark. *PLoS One* 9, e100018.
- Kristiansen, K. (2004). Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacology & therapeutics* 103, 21-80.
- Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A.M., and Hartmann, G. (2001). Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 31, 3026-3037.

- Kufareva, I., Stephens, B.S., Holden, L.G., Qin, L., Zhao, C., Kawamura, T., Abagyan, R., and Handel, T.M. (2014). Stoichiometry and geometry of the CXC chemokine receptor 4 complex with CXC ligand 12: molecular modeling and experimental validation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, E5363-5372.
- Kuhl, K., and Hanania, N.A. (2012). Targeting IgE in asthma. *Current opinion in pulmonary medicine* *18*, 1-5.
- Kumagai, Y., Takeuchi, O., Kato, H., Kumar, H., Matsui, K., Morii, E., Aozasa, K., Kawai, T., and Akira, S. (2007). Alveolar macrophages are the primary interferon-alpha producer in pulmonary infection with RNA viruses. *Immunity* *27*, 240-252.
- LaFleur, D.W., Nardelli, B., Tsareva, T., Mather, D., Feng, P., Semenuk, M., Taylor, K., Buergin, M., Chinchilla, D., Roshke, V., et al. (2001). Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes. *J Biol Chem* *276*, 39765-39771.
- Lakhani, S.A., Masud, A., Kuida, K., Porter, G.A., Jr., Booth, C.J., Mehal, W.Z., Inayat, I., and Flavell, R.A. (2006). Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* *311*, 847-851.
- Lande, R., Gafa, V., Serafini, B., Giacomini, E., Visconti, A., Remoli, M.E., Severa, M., Parmentier, M., Ristori, G., Salvetti, M., et al. (2008). Plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis: intracerebral recruitment and impaired maturation in response to interferon-beta. *Journal of neuropathology and experimental neurology* *67*, 388-401.
- Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y.H., Homey, B., Cao, W., Wang, Y.H., Su, B., Nestle, F.O., et al. (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* *449*, 564-569.
- Lappano, R., and Maggiolini, M. (2011). G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat Rev Drug Discov* *10*, 47-60.
- Larche, M., Akdis, C.A., and Valenta, R. (2006). Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* *6*, 761-771.
- Latz, E., Verma, A., Visintin, A., Gong, M., Sirois, C.M., Klein, D.C., Monks, B.G., McKnight, C.J., Lamphier, M.S., Duprex, W.P., et al. (2007). Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* *8*, 772-779.
- Lauwerys, B.R., Hachulla, E., Spertini, F., Lazaro, E., Jorgensen, C., Mariette, X., Haelterman, E., Grouard-Vogel, G., Fanget, B., Dhellin, O., et al. (2013). Down-regulation of interferon signature in systemic lupus erythematosus patients by active immunization with interferon alpha-kinoid. *Arthritis Rheum* *65*, 447-456.
- Lavrik, I.N., Golks, A., and Krammer, P.H. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* *115*, 2665-2672.
- Lederle, A., Su, B., Holl, V., Penichon, J., Schmidt, S., Decoville, T., Laumond, G., and Moog, C. (2014). Neutralizing antibodies inhibit HIV-1 infection of plasmacytoid dendritic cells by an FcγRIIIa independent mechanism and do not diminish cytokines production. *Scientific reports* *4*, 5845.
- Lee, B.L., and Barton, G.M. (2014). Trafficking of endosomal Toll-like receptors. *Trends in cell biology* *24*, 360-369.
- Lee, J., Chuang, T.H., Redecke, V., She, L., Pitha, P.M., Carson, D.A., Raz, E., and Cottam, H.B. (2003). Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 6646-6651.
- Lefkowitz, R.J. (1998). G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem* *273*, 18677-18680.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* *86*, 973-983.
- Lemke, J., von Karstedt, S., Zinngrebe, J., and Walczak, H. (2014). Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death Differ* *21*, 1350-1364.
- Lennert, K., and Remmele, W. (1958). [Measurement of the cell nucleus in the lymph node cells of man. II. Reticulum cells and endothelial cells]. *Acta haematologica* *20*, 301-317.

- Lepelletier, Y., Zollinger, R., Ghirelli, C., Raynaud, F., Hadj-Slimane, R., Cappuccio, A., Hermine, O., Liu, Y.J., and Soumelis, V. (2010). Toll-like receptor control of glucocorticoid-induced apoptosis in human plasmacytoid dendritic cells (pDCs). *Blood* 116, 3389-3397.
- Lesinski, G.B., Anghelina, M., Zimmerer, J., Bakalakos, T., Badgwell, B., Parihar, R., Hu, Y., Becknell, B., Abood, G., Chaudhury, A.R., et al. (2003). The antitumor effects of IFN- $\alpha$  are abrogated in a STAT1-deficient mouse. *J Clin Invest* 112, 170-180.
- Levy, D.E. (2002). Whence interferon? Variety in the production of interferon in response to viral infection. *J Exp Med* 195, F15-18.
- Li, G., Cheng, M., Nunoya, J., Cheng, L., Guo, H., Yu, H., Liu, Y.J., Su, L., and Zhang, L. (2014). Plasmacytoid dendritic cells suppress HIV-1 replication but contribute to HIV-1 induced immunopathogenesis in humanized mice. *PLoS Pathog* 10, e1004291.
- Li, X.D., Wu, J., Gao, D., Wang, H., Sun, L., and Chen, Z.J. (2013). Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. *Science* 341, 1390-1394.
- Liabakk, N.B., and Espevik, T. (2004). Monoclonal antibodies against TRAIL. *Vitamins and hormones* 67, 65-79.
- Liabakk, N.B., Sundan, A., Torp, S., Aukrust, P., Froland, S.S., and Espevik, T. (2002). Development, characterization and use of monoclonal antibodies against sTRAIL: measurement of sTRAIL by ELISA. *J Immunol Methods* 259, 119-128.
- Lim, H.D., Istyastono, E.P., van de Stolpe, A., Romeo, G., Gobbi, S., Schepers, M., Lahaye, R., Menge, W.M., Zuiderveld, O.P., Jongejan, A., et al. (2009). Clobenpropit analogs as dual activity ligands for the histamine H3 and H4 receptors: synthesis, pharmacological evaluation, and cross-target QSAR studies. *Bioorganic & medicinal chemistry* 17, 3987-3994.
- Lindau, D., Mussard, J., Wagner, B.J., Ribon, M., Ronnefarth, V.M., Quettier, M., Jelcic, I., Boissier, M.C., Rammensee, H.G., and Decker, P. (2013). Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9. *Eur J Immunol* 43, 2101-2113.
- Liu, Y.J. (2005). IPC: professional type I interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23, 275-306.
- Lockshin, R.A.W., C. M. (1964). Programmed cell death — II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *Journal of Insect Physiology* 10, 643-649.
- Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.
- Lotrich, F.E. (2009). Major depression during interferon- $\alpha$  treatment: vulnerability and prevention. *Dialogues in clinical neuroscience* 11, 417-425.
- Lowe, S.W., Bodis, S., McClatchey, A., Remington, L., Ruley, H.E., Fisher, D.E., Housman, D.E., and Jacks, T. (1994). p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 266, 807-810.
- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R., and Iwasaki, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 198, 513-520.
- Lund, J.M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N.C., Gale, N.W., Iwasaki, A., and Flavell, R.A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5598-5603.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.
- Lynch, S.V., Wood, R.A., Boushey, H., Bacharier, L.B., Bloomberg, G.R., Kattan, M., O'Connor, G.T., Sandel, M.T., Calatroni, A., Matsui, E., et al. (2014). Effects of early-life exposure to allergens and bacteria on recurrent wheeze and atopy in urban children. *The Journal of allergy and clinical immunology* 134, 593-601 e512.
- MacDonald, K.P., Munster, D.J., Clark, G.J., Dzionek, A., Schmitz, J., and Hart, D.N. (2002). Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 100, 4512-4520.

- MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S.M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen, G.M., and Alnemri, E.S. (1997). Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 272, 25417-25420.
- MacMicking, J.D. (2012). Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat Rev Immunol* 12, 367-382.
- Maeda, T., Murata, K., Fukushima, T., Sugahara, K., Tsuruda, K., Anami, M., Onimaru, Y., Tsukasaki, K., Tomonaga, M., Moriuchi, R., et al. (2005). A novel plasmacytoid dendritic cell line, CAL-1, established from a patient with blastic natural killer cell lymphoma. *Int J Hematol* 81, 148-154.
- Malathi, K., Dong, B., Gale, M., Jr., and Silverman, R.H. (2007). Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* 448, 816-819.
- Manca, C., Tsenova, L., Bergtold, A., Freeman, S., Tovey, M., Musser, J.M., Barry, C.E., 3rd, Freedman, V.H., and Kaplan, G. (2001). Virulence of a Mycobacterium tuberculosis clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha/beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5752-5757.
- Manca, C., Tsenova, L., Freeman, S., Barczak, A.K., Tovey, M., Murray, P.J., Barry, C., and Kaplan, G. (2005). Hypervirulent M. tuberculosis W/Beijing strains upregulate type I IFNs and increase expression of negative regulators of the Jak-Stat pathway. *J Interferon Cytokine Res* 25, 694-701.
- Manches, O., Frleta, D., and Bhardwaj, N. (2014). Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection. *Trends Immunol* 35, 114-122.
- Mancuso, G., Gambuzza, M., Midiri, A., Biondo, C., Papasergi, S., Akira, S., Teti, G., and Beninati, C. (2009). Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol* 10, 587-594.
- Marie, I., Durbin, J.E., and Levy, D.E. (1998). Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J* 17, 6660-6669.
- Marques, J.T., and Williams, B.R. (2005). Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *Nat Biotechnol* 23, 1399-1405.
- Marrero, M.B., Schieffer, B., Paxton, W.G., Heerdt, L., Berk, B.C., Delafontaine, P., and Bernstein, K.E. (1995). Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* 375, 247-250.
- Marshak-Rothstein, A. (2006). Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 6, 823-835.
- Martin-Martin, L., Almeida, J., Hernandez-Campo, P.M., Sanchez, M.L., Lecrevisse, Q., and Orfao, A. (2009). Immunophenotypical, morphologic, and functional characterization of maturation-associated plasmacytoid dendritic cell subsets in normal adult human bone marrow. *Transfusion* 49, 1692-1708.
- Martinez-Lorenzo, M.J., Alava, M.A., Gamen, S., Kim, K.J., Chuntharapai, A., Pineiro, A., Naval, J., and Anel, A. (1998). Involvement of APO2 ligand/TRAIL in activation-induced death of Jurkat and human peripheral blood T cells. *Eur J Immunol* 28, 2714-2725.
- Maschalidi, S., Hassler, S., Blanc, F., Sepulveda, F.E., Tohme, M., Chignard, M., van Endert, P., Si-Tahar, M., Descamps, D., and Manoury, B. (2012). Asparagine endopeptidase controls anti-influenza virus immune responses through TLR7 activation. *PLoS Pathog* 8, e1002841.
- Mazzoni, A., Leifer, C.A., Mullen, G.E., Kennedy, M.N., Klinman, D.M., and Segal, D.M. (2003). Cutting edge: histamine inhibits IFN-alpha release from plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 170, 2269-2273.
- Mazzoni, A., Young, H.A., Spitzer, J.H., Visintin, A., and Segal, D.M. (2001). Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *J Clin Invest* 108, 1865-1873.
- McDonald, P.H., and Lefkowitz, R.J. (2001). Beta-Arrestins: new roles in regulating heptahelical receptors' functions. *Cellular signalling* 13, 683-689.
- McKenna, K., Beignon, A.S., and Bhardwaj, N. (2005). Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *J Virol* 79, 17-27.



- McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., and O'Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 15, 87-103.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1, 135-145.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. (1997a). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9, 4-9.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. (1997b). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91, 295-298.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296, 298-300.
- Meier, A., Chang, J.J., Chan, E.S., Pollard, R.B., Sidhu, H.K., Kulkarni, S., Wen, T.F., Lindsay, R.J., Orellana, L., Mildvan, D., et al. (2009). Sex differences in the Toll-like receptor-mediated response of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1. *Nat Med*.
- Meier, P., Finch, A., and Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature* 407, 796-801.
- Meister, G., and Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343-349.
- Melchjorsen, J., Jensen, S.B., Malmgaard, L., Rasmussen, S.B., Weber, F., Bowie, A.G., Matikainen, S., and Paludan, S.R. (2005). Activation of innate defense against a paramyxovirus is mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a cell-type-specific manner. *J Virol* 79, 12944-12951.
- Merino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Schneider, P., Solary, E., and Micheau, O. (2006). Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol Cell Biol* 26, 7046-7055.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., and Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437, 1167-1172.
- Michea, P., Vargas, P., Donnadieu, M.H., Roseblatt, M., Bono, M.R., Dumenil, G., and Soumelis, V. (2013). Epithelial control of the human pDC response to extracellular bacteria. *Eur J Immunol* 43, 1264-1273.
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D.W., Briand, C., and Grutter, M.G. (2002). The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 277, 45162-45171.
- Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor 1-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181-190.
- Miller, E., and Bhardwaj, N. (2013). Dendritic cell dysregulation during HIV-1 infection. *Immunological reviews* 254, 170-189.
- Miller-Fleming, L., Olin-Sandoval, V., Campbell, K., and Ralser, M. (2015). Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *J Mol Biol*.
- Moir, S., Chun, T.W., and Fauci, A.S. (2011). Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol* 6, 223-248.
- Mongkolsapaya, J., Grimes, J.M., Chen, N., Xu, X.N., Stuart, D.I., Jones, E.Y., and Screaton, G.R. (1999). Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. *Nature structural biology* 6, 1048-1053.
- Moreau, R.J., and Sorensen, E.J. (2007). Classical carbonyl reactivity enables a short synthesis of the core structure of acutumine. *Tetrahedron* 63, 6446-6453.
- Morichika, T., Takahashi, H.K., Iwagaki, H., Yoshino, T., Tamura, R., Yokoyama, M., Mori, S., Akagi, T., Nishibori, M., and Tanaka, N. (2003). Histamine inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production in an intercellular adhesion molecule-1- and B7.1-dependent manner. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 304, 624-633.
- Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L.F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R.M., and Aguet, M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264, 1918-1921.
- Munch, J., Rucker, E., Standker, L., Adermann, K., Goffinet, C., Schindler, M., Wildum, S., Chinnadurai, R., Rajan, D., Specht, A., et al. (2007). Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell* 131, 1059-1071.

- Munch, J., Sauermann, U., Yolamanova, M., Raue, K., Stahl-Hennig, C., and Kirchhoff, F. (2013). Effect of semen and seminal amyloid on vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *Retrovirology* 10, 148.
- Murray, P.J. (2007). The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* 178, 2623-2629.
- Nagasawa, T. (2015). CXCL12/SDF-1 and CXCR4. *Frontiers in immunology* 6, 301.
- Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1996a). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382, 635-638.
- Nagasawa, T., Nakajima, T., Tachibana, K., Iizasa, H., Bleul, C.C., Yoshie, O., Matsushima, K., Yoshida, N., Springer, T.A., and Kishimoto, T. (1996b). Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14726-14729.
- Nagata, S., Taira, H., Hall, A., Johnsrud, L., Streuli, M., Ecsodi, J., Boll, W., Cantell, K., and Weissmann, C. (1980). Synthesis in *E. coli* of a polypeptide with human leukocyte interferon activity. *Nature* 284, 316-320.
- Naik, S.H., Corcoran, L.M., and Wu, L. (2005a). Development of murine plasmacytoid dendritic cell subsets. *Immunol Cell Biol* 83, 563-570.
- Naik, S.H., Proietto, A.I., Wilson, N.S., Dakic, A., Schnorrer, P., Fuchsberger, M., Lahoud, M.H., O'Keeffe, M., Shao, Q.X., Chen, W.F., et al. (2005b). Cutting edge: generation of splenic CD8<sup>+</sup> and CD8<sup>-</sup> dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J Immunol* 174, 6592-6597.
- Nardelli, B., Zaritskaya, L., Semenuk, M., Cho, Y.H., LaFleur, D.W., Shah, D., Ullrich, S., Girolomoni, G., Albanesi, C., and Moore, P.A. (2002). Regulatory effect of IFN-kappa, a novel type I IFN, on cytokine production by cells of the innate immune system. *J Immunol* 169, 4822-4830.
- Narita, M., Watanabe, N., Yamahira, A., Hashimoto, S., Tochiki, N., Saitoh, A., Kaji, M., Nakamura, T., Furukawa, T., Toba, K., et al. (2009). A leukemic plasmacytoid dendritic cell line, PMDC05, with the ability to secrete IFN-alpha by stimulation via Toll-like receptors and present antigens to naive T cells. *Leuk Res* 33, 1224-1232.
- Nathan, C., and Shiloh, M.U. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8841-8848.
- Negishi, H., Ohba, Y., Yanai, H., Takaoka, A., Honma, K., Yui, K., Matsuyama, T., Taniguchi, T., and Honda, K. (2005). Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15989-15994.
- Neil, S.J., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451, 425-430.
- Nials, A.T., and Uddin, S. (2008). Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Disease models & mechanisms* 1, 213-220.
- Niessner, A., Sato, K., Chaikof, E.L., Colmegna, I., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (2006). Pathogen-sensing plasmacytoid dendritic cells stimulate cytotoxic T-cell function in the atherosclerotic plaque through interferon-alpha. *Circulation* 114, 2482-2489.
- Novak, N., Kraft, S., and Bieber, T. (2001). IgE receptors. *Curr Opin Immunol* 13, 721-726.
- Novick, D., Cohen, B., and Rubinstein, M. (1994). The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* 77, 391-400.
- Nygaard, R., Frimurer, T.M., Holst, B., Rosenkilde, M.M., and Schwartz, T.W. (2009). Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures. *Trends in pharmacological sciences* 30, 249-259.
- O'Brien, M., Manches, O., and Bhardwaj, N. (2013). Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection. *Adv Exp Med Biol* 762, 71-107.
- O'Brien, M., Manches, O., Sabado, R.L., Baranda, S.J., Wang, Y., Marie, I., Rolnitzky, L., Markowitz, M., Margolis, D.M., Levy, D., and Bhardwaj, N. (2011). Spatiotemporal trafficking of HIV in human

- plasmacytoid dendritic cells defines a persistently IFN- $\alpha$ -producing and partially matured phenotype. *J Clin Invest* 121, 1088-1101.
- O'Doherty, U., Peng, M., Gezelter, S., Swiggard, W.J., Betjes, M., Bhardwaj, N., and Steinman, R.M. (1994). Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 82, 487-493.
- O'Mahony, L., Akdis, M., and Akdis, C.A. (2011). Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. *The Journal of allergy and clinical immunology* 128, 1153-1162.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S., and Caron, M.G. (2001). Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis\*. *J Biol Chem* 276, 19452-19460.
- Oganesyan, G., Saha, S.K., Guo, B., He, J.Q., Shahangian, A., Zarnegar, B., Perry, A., and Cheng, G. (2006). Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 439, 208-211.
- Ohto, U., Shibata, T., Tanji, H., Ishida, H., Krayukhina, E., Uchiyama, S., Miyake, K., and Shimizu, T. (2015). Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. *Nature* 520, 702-705.
- Oishi, M., Nagasaki, Y., Itaka, K., Nishiyama, N., and Kataoka, K. (2005). Lactosylated poly(ethylene glycol)-siRNA conjugate through acid-labile beta-thiopropionate linkage to construct pH-sensitive polyion complex micelles achieving enhanced gene silencing in hepatoma cells. *Journal of the American Chemical Society* 127, 1624-1625.
- Ojaniemi, M., Glumoff, V., Harju, K., Liljeroos, M., Vuori, K., and Hallman, M. (2003). Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in Toll-like receptor 4-mediated cytokine expression in mouse macrophages. *European journal of immunology* 33, 597-605.
- Okada, T., Lian, Z.X., Naiki, M., Ansari, A.A., Ikehara, S., and Gershwin, M.E. (2003). Murine thymic plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 33, 1012-1019.
- Oldham, W.M., and Hamm, H.E. (2006). Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Quarterly reviews of biophysics* 39, 117-166.
- Olivier, M., Hollstein, M., and Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a001008.
- Olweus, J., BitMansour, A., Warnke, R., Thompson, P.A., Carballido, J., Picker, L.J., and Lund-Johansen, F. (1997). Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12551-12556.
- Onai, N., Kurabayashi, K., Hosoi-Amaike, M., Toyama-Sorimachi, N., Matsushima, K., Inaba, K., and Ohteki, T. (2013). A clonogenic progenitor with prominent plasmacytoid dendritic cell developmental potential. *Immunity* 38, 943-957.
- Onji, M., Kanno, A., Saitoh, S., Fukui, R., Motoi, Y., Shibata, T., Matsumoto, F., Lamichhane, A., Sato, S., Kiyono, H., et al. (2013). An essential role for the N-terminal fragment of Toll-like receptor 9 in DNA sensing. *Nature communications* 4, 1949.
- Osawa, Y., Iho, S., Takauji, R., Takatsuka, H., Yamamoto, S., Takahashi, T., Horiguchi, S., Urasaki, Y., Matsuki, T., and Fujieda, S. (2006). Collaborative action of NF-kappaB and p38 MAPK is involved in CpG DNA-induced IFN- $\alpha$  and chemokine production in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 177, 4841-4852.
- Ozato, K., Shin, D.M., Chang, T.H., and Morse, H.C., 3rd (2008). TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 8, 849-860.
- Pan, G., Ni, J., Wei, Y.F., Yu, G., Gentz, R., and Dixit, V.M. (1997). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277, 815-818.
- Parcina, M., Miranda-Garcia, M.A., Durlanik, S., Ziegler, S., Over, B., Georg, P., Foermer, S., Ammann, S., Hilmi, D., Weber, K.J., et al. (2013). Pathogen-triggered activation of plasmacytoid dendritic cells induces IL-10-producing B cells in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 190, 1591-1602.

- Park, B., Brinkmann, M.M., Spooner, E., Lee, C.C., Kim, Y.M., and Ploegh, H.L. (2008). Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* 9, 1407-1414.
- Park, S.M., Schickel, R., and Peter, M.E. (2005). Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. *Curr Opin Cell Biol* 17, 610-616.
- Pascual, V., Farkas, L., and Banchereau, J. (2006). Systemic lupus erythematosus: all roads lead to type I interferons. *Curr Opin Immunol* 18, 676-682.
- Paton, N.I., Lee, L., Xu, Y., Ooi, E.E., Cheung, Y.B., Archuleta, S., Wong, G., and Wilder-Smith, A. (2011). Chloroquine for influenza prevention: a randomised, double-blind, placebo controlled trial. *Lancet Infect Dis* 11, 677-683.
- Paul, S., and Regulier, E. (2002). [Cancer genetic immunotherapy]. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine* 9, 301-321.
- Pegg, A.E. (2009). Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB life* 61, 880-894.
- Pegg, A.E. (2013). Toxicity of polyamines and their metabolic products. *Chem Res Toxicol* 26, 1782-1800.
- Pegg, A.E. (2014). The function of spermine. *IUBMB life* 66, 8-18.
- Pelekanos, R.A., Ting, M.J., Sardesai, V.S., Ryan, J.M., Lim, Y.C., Chan, J.K., and Fisk, N.M. (2014). Intracellular trafficking and endocytosis of CXCR4 in fetal mesenchymal stem/stromal cells. *BMC cell biology* 15, 15.
- Pellerin, A., Otero, K., Czerkowicz, J.M., Kerns, H.M., Shapiro, R.I., Ranger, A.M., Otipoby, K.L., Taylor, F.R., Cameron, T.O., Viney, J.L., and Rabah, D. (2015). Anti-BDCA2 monoclonal antibody inhibits plasmacytoid dendritic cell activation through Fc-dependent and Fc-independent mechanisms. *EMBO molecular medicine* 7, 464-476.
- Penna, G., Sozzani, S., and Adorini, L. (2001). Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 167, 1862-1866.
- Penna, G., Vulcano, M., Sozzani, S., and Adorini, L. (2002). Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 63, 1164-1171.
- Perez-Cano, F.J., Franch, A., Castellote, C., and Castell, M. (2003). Immunomodulatory action of spermine and spermidine on NR8383 macrophage line in various culture conditions. *Cell Immunol* 226, 86-94.
- Persson, B.C., Jager, G., and Gustafsson, C. (1997). The spoU gene of Escherichia coli, the fourth gene of the spoT operon, is essential for tRNA (Gm18) 2'-O-methyltransferase activity. *Nucleic acids research* 25, 4093-4097.
- Pestka, S., Krause, C.D., and Walter, M.R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202, 8-32.
- Peter, M.E., and Krammer, P.H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10, 26-35.
- Petzke, M.M., Brooks, A., Krupna, M.A., Mordue, D., and Schwartz, I. (2009). Recognition of Borrelia burgdorferi, the Lyme disease spirochete, by TLR7 and TLR9 induces a type I IFN response by human immune cells. *J Immunol* 183, 5279-5292.
- Pisetsky, D.S., and Fairhurst, A.M. (2007). The origin of extracellular DNA during the clearance of dead and dying cells. *Autoimmunity* 40, 281-284.
- Pitti, R.M., Marsters, S.A., Ruppert, S., Donahue, C.J., Moore, A., and Ashkenazi, A. (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 271, 12687-12690.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., et al. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088.
- Pop, C., and Salvesen, G.S. (2009). Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* 284, 21777-21781.

- Presti, R.M., Pollock, J.L., Dal Canto, A.J., O'Guin, A.K., and Virgin, H.W.t. (1998). Interferon gamma regulates acute and latent murine cytomegalovirus infection and chronic disease of the great vessels. *J Exp Med* 188, 577-588.
- Pritschet, K., Donhauser, N., Schuster, P., Ries, M., Haupt, S., Kittan, N.A., Korn, K., Pohlmann, S., Holland, G., Bannert, N., et al. (2012). CD4- and dynamin-dependent endocytosis of HIV-1 into plasmacytoid dendritic cells. *Virology* 423, 152-164.
- Prokunina-Olsson, L., Muchmore, B., Tang, W., Pfeiffer, R.M., Park, H., Dickensheets, H., Hergott, D., Porter-Gill, P., Mumy, A., Kohaar, I., et al. (2013). A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat Genet* 45, 164-171.
- Pryor, P.R., and Luzio, J.P. (2009). Delivery of endocytosed membrane proteins to the lysosome. *Biochim Biophys Acta* 1793, 615-624.
- Qin, K., Dong, C., Wu, G., and Lambert, N.A. (2011). Inactive-state preassembly of G(q)-coupled receptors and G(q) heterotrimers. *Nature chemical biology* 7, 740-747.
- Qin, L., Kufareva, I., Holden, L.G., Wang, C., Zheng, Y., Zhao, C., Fenalti, G., Wu, H., Han, G.W., Cherezov, V., et al. (2015). Structural biology. Crystal structure of the chemokine receptor CXCR4 in complex with a viral chemokine. *Science* 347, 1117-1122.
- Quoyer, J., Janz, J.M., Luo, J., Ren, Y., Armando, S., Lukashova, V., Benovic, J.L., Carlson, K.E., Hunt, S.W., 3rd, and Bouvier, M. (2013). Pepducin targeting the C-X-C chemokine receptor type 4 acts as a biased agonist favoring activation of the inhibitory G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E5088-5097.
- Rathinam, V.A., Jiang, Z., Waggoner, S.N., Sharma, S., Cole, L.E., Waggoner, L., Vanaja, S.K., Monks, B.G., Ganesan, S., Latz, E., et al. (2010). The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol* 11, 395-402.
- Reed, J.C., Doctor, K.S., and Godzik, A. (2004). The domains of apoptosis: a genomics perspective. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2004, re9.
- Reeves, R.K., Evans, T.I., Gillis, J., Wong, F.E., Kang, G., Li, Q., and Johnson, R.P. (2012). SIV infection induces accumulation of plasmacytoid dendritic cells in the gut mucosa. *J Infect Dis* 206, 1462-1468.
- Reiter, E., Ahn, S., Shukla, A.K., and Lefkowitz, R.J. (2012). Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology* 52, 179-197.
- 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.
- Ries, M., Pritschet, K., and Schmidt, B. (2012). Blocking type I interferon production: a new therapeutic option to reduce the HIV-1-induced immune activation. *Clin Dev Immunol* 2012, 534929.
- Rigby, R.E., Webb, L.M., Mackenzie, K.J., Li, Y., Leitch, A., Reijns, M.A., Lundie, R.J., Revuelta, A., Davidson, D.J., Diebold, S., et al. (2014). RNA:DNA hybrids are a novel molecular pattern sensed by TLR9. *EMBO J* 33, 542-558.
- Rimbach, K., Kaiser, S., Helm, M., Dalpke, A.H., and Eigenbrod, T. (2015). 2'-O-Methylation within Bacterial RNA Acts as Suppressor of TLR7/TLR8 Activation in Human Innate Immune Cells. *Journal of innate immunity*.
- Roach, J.C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M.K., Smith, K.D., Hood, L.E., and Aderem, A. (2005). The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9577-9582.
- Robbins, M., Judge, A., Liang, L., McClintock, K., Yaworski, E., and MacLachlan, I. (2007). 2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists. *Mol Ther* 15, 1663-1669.
- Robertson, N.M., Zangrilli, J.G., Steplewski, A., Hastie, A., Lindemeyer, R.G., Planeta, M.A., Smith, M.K., Innocent, N., Musani, A., Pascual, R., et al. (2002). Differential expression of TRAIL and TRAIL receptors in allergic asthmatics following segmental antigen challenge: evidence for a role of TRAIL in eosinophil survival. *J Immunol* 169, 5986-5996.

- Rock, J., Schneider, E., Grun, J.R., Grutzkau, A., Kuppers, R., Schmitz, J., and Winkels, G. (2007). CD303 (BDCA-2) signals in plasmacytoid dendritic cells via a BCR-like signalosome involving Syk, Slp65 and PLCgamma2. *Eur J Immunol* 37, 3564-3575.
- Rodriguez, K.R., and Horvath, C.M. (2014). Paramyxovirus V protein interaction with the antiviral sensor LGP2 disrupts MDA5 signaling enhancement but is not relevant to LGP2-mediated RLR signaling inhibition. *J Virol* 88, 8180-8188.
- Rosenkilde, M.M., Gerlach, L.O., Jakobsen, J.S., Skerlj, R.T., Bridger, G.J., and Schwartz, T.W. (2004). Molecular mechanism of AMD3100 antagonism in the CXCR4 receptor: transfer of binding site to the CXCR3 receptor. *The Journal of biological chemistry* 279, 3033-3041.
- Rossio, J.L., Esser, M.T., Suryanarayana, K., Schneider, D.K., Bess, J.W., Jr., Vasquez, G.M., Wiltrout, T.A., Chertova, E., Grimes, M.K., Sattentau, Q., et al. (1998). Inactivation of human immunodeficiency virus type I infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins. *J Virol* 72, 7992-8001.
- Rowe, R.K., and Gill, M.A. (2015). Asthma: the interplay between viral infections and allergic diseases. *Immunology and allergy clinics of North America* 35, 115-127.
- Rowland, S.L., Riggs, J.M., Gilfillan, S., Bugatti, M., Vermi, W., Kolbeck, R., Unanue, E.R., Sanjuan, M.A., and Colonna, M. (2014). Early, transient depletion of plasmacytoid dendritic cells ameliorates autoimmunity in a lupus model. *J Exp Med* 211, 1977-1991.
- Rutz, M., Metzger, J., Gellert, T., Lippa, P., Lipford, G.B., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol* 34, 2541-2550.
- Ryu, E.K., Kim, T.G., Kwon, T.H., Jung, I.D., Ryu, D., Park, Y.M., Kim, J., Ahn, K.H., and Ban, C. (2007). Crystal structure of recombinant human stromal cell-derived factor-1alpha. *Proteins* 67, 1193-1197.
- Sabbah, A., Chang, T.H., Harnack, R., Frohlich, V., Tominaga, K., Dube, P.H., Xiang, Y., and Bose, S. (2009). Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nat Immunol* 10, 1073-1080.
- Salmon-Chemin, L., Buisine, E., Yardley, V., Kohler, S., Debreu, M.A., Landry, V., Sergheraert, C., Croft, S.L., Krauth-Siegel, R.L., and Davioud-Charvet, E. (2001). 2- and 3-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Synthesis and correlation between redox cycling activities and in vitro cytotoxicity. *J Med Chem* 44, 548-565.
- Sandgren, S., Wittrup, A., Cheng, F., Jonsson, M., Eklund, E., Busch, S., and Belting, M. (2004). The human antimicrobial peptide LL-37 transfers extracellular DNA plasmid to the nuclear compartment of mammalian cells via lipid rafts and proteoglycan-dependent endocytosis. *J Biol Chem* 279, 17951-17956.
- Sandler, N.G., Bosinger, S.E., Estes, J.D., Zhu, R.T., Tharp, G.K., Boritz, E., Levin, D., Wijeyesinghe, S., Makamdop, K.N., del Prete, G.Q., et al. (2014). Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature* 511, 601-605.
- Sasai, M., Linehan, M.M., and Iwasaki, A. (2010). Bifurcation of Toll-like receptor 9 signaling by adaptor protein 3. *Science* 329, 1530-1534.
- Sato, K., Hida, S., Takayanagi, H., Yokochi, T., Kayagaki, N., Takeda, K., Yagita, H., Okumura, K., Tanaka, N., Taniguchi, T., and Ogasawara, K. (2001). Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur J Immunol* 31, 3138-3146.
- Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N., and Taniguchi, T. (2000). Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 13, 539-548.
- Sato, M., Tanaka, N., Hata, N., Oda, E., and Taniguchi, T. (1998). Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN-beta gene. *FEBS Lett* 425, 112-116.
- Saudemont, A., Garcon, F., Yadi, H., Roche-Molina, M., Kim, N., Segonds-Pichon, A., Martin-Fontecha, A., Okkenhaug, K., and Colucci, F. (2009). p110gamma and p110delta isoforms of phosphoinositide 3-kinase differentially regulate natural killer cell migration in health and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5795-5800.

- Savarino, A., Boelaert, J.R., Cassone, A., Majori, G., and Cauda, R. (2003). Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases? *Lancet Infect Dis* 3, 722-727.
- Savarino, A., Gennero, L., Chen, H.C., Serrano, D., Malavasi, F., Boelaert, J.R., and Sperber, K. (2001a). Anti-HIV effects of chloroquine: mechanisms of inhibition and spectrum of activity. *AIDS* 15, 2221-2229.
- Savarino, A., Gennero, L., Sperber, K., and Boelaert, J.R. (2001b). The anti-HIV-1 activity of chloroquine. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 20, 131-135.
- Sawai, C.M., Sisirak, V., Ghosh, H.S., Hou, E.Z., Ceribelli, M., Staudt, L.M., and Reizis, B. (2013). Transcription factor Runx2 controls the development and migration of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 210, 2151-2159.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17, 1675-1687.
- Schmid, M.C., Avraamides, C.J., Dippold, H.C., Franco, I., Foubert, P., Ellies, L.G., Acevedo, L.M., Manglicmot, J.R., Song, X., Wrasidlo, W., et al. (2011). Receptor tyrosine kinases and TLR/ILIRs unexpectedly activate myeloid cell PI3Kgamma, a single convergent point promoting tumor inflammation and progression. *Cancer Cell* 19, 715-727.
- Schmidt, B., Ashlock, B.M., Foster, H., Fujimura, S.H., and Levy, J.A. (2005). HIV-infected cells are major inducers of plasmacytoid dendritic cell interferon production, maturation, and migration. *Virology* 343, 256-266.
- Schmitz, I., Kirchhoff, S., and Krammer, P.H. (2000). Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *The international journal of biochemistry & cell biology* 32, 1123-1136.
- Schnittman, S.M., Psallidopoulos, M.C., Lane, H.C., Thompson, L., Baseler, M., Massari, F., Fox, C.H., Salzman, N.P., and Fauci, A.S. (1989). The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science* 245, 305-308.
- Schoenemeyer, A., Barnes, B.J., Mancl, M.E., Latz, E., Goutagny, N., Pitha, P.M., Fitzgerald, K.A., and Golenbock, D.T. (2005). The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling. *The Journal of biological chemistry* 280, 17005-17012.
- Schols, D., Este, J.A., Henson, G., and De Clercq, E. (1997). Bicyclams, a class of potent anti-HIV agents, are targeted at the HIV coreceptor fusin/CXCR-4. *Antiviral Res* 35, 147-156.
- Schotte, R., Nagasawa, M., Weijer, K., Spits, H., and Blom, B. (2004). The ETS transcription factor Spi-B is required for human plasmacytoid dendritic cell development. *J Exp Med* 200, 1503-1509.
- Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565-1570.
- Schwartz, T.W., Frimurer, T.M., Holst, B., Rosenkilde, M.M., and Elling, C.E. (2006). Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model. *Annual review of pharmacology and toxicology* 46, 481-519.
- Sepulveda, F.E., Maschalidi, S., Colisson, R., Heslop, L., Ghirelli, C., Sakka, E., Lennon-Dumenil, A.M., Amigorena, S., Cabanie, L., and Manoury, B. (2009). Critical role for asparagine endopeptidase in endocytic Toll-like receptor signaling in dendritic cells. *Immunity* 31, 737-748.
- Sharkey, D.J., Macpherson, A.M., Tremellen, K.P., and Robertson, S.A. (2007). Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. *Molecular human reproduction* 13, 491-501.
- Shigeno, M., Nakao, K., Ichikawa, T., Suzuki, K., Kawakami, A., Abiru, S., Miyazoe, S., Nakagawa, Y., Ishikawa, H., Hamasaki, K., et al. (2003). Interferon-alpha sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation and NF-kappa B inactivation. *Oncogene* 22, 1653-1662.
- Shinohara, M.L., Lu, L., Bu, J., Werneck, M.B., Kobayashi, K.S., Glimcher, L.H., and Cantor, H. (2006). Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nature immunology* 7, 498-506.

- Shu, C., Yi, G., Watts, T., Kao, C.C., and Li, P. (2012). Structure of STING bound to cyclic di-GMP reveals the mechanism of cyclic dinucleotide recognition by the immune system. *Nat Struct Mol Biol* 19, 722-724.
- Shukla, A.K., Xiao, K., and Lefkowitz, R.J. (2011). Emerging paradigms of beta-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends in biochemical sciences* 36, 457-469.
- 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 I interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835-1837.
- Signoret, N., Rosenkilde, M.M., Klasse, P.J., Schwartz, T.W., Malim, M.H., Hoxie, J.A., and Marsh, M. (1998). Differential regulation of CXCR4 and CCR5 endocytosis. *Journal of cell science* 111 ( Pt 18), 2819-2830.
- Sioud, M., Furset, G., and Cekaite, L. (2007). Suppression of immunostimulatory siRNA-driven innate immune activation by 2'-modified RNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 361, 122-126.
- Sistigu, A., Yamazaki, T., Vacchelli, E., Chaba, K., Enot, D.P., Adam, J., Vitale, I., Goubar, A., Baracco, E.E., Remedios, C., et al. (2014). Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nat Med* 20, 1301-1309.
- Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., et al. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 144, 281-292.
- Smith, C.A., Farrah, T., and Goodwin, R.G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 959-962.
- Smith, N., Etheve-Quellejeu, M., and Herbeuval, J.P. (2014). CD4 and Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Ligand (TRAIL) localization in HIV-stimulated plasmacytoid dendritic cells by three-dimensional microscopy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 30, 1158-1159.
- Sozzani, S., Vermi, W., Del Prete, A., and Facchetti, F. (2010). Trafficking properties of plasmacytoid dendritic cells in health and disease. *Trends Immunol* 31, 270-277.
- Spierings, D.C., de Vries, E.G., Vellenga, E., van den Heuvel, F.A., Koornstra, J.J., Wesseling, J., Hollema, H., and de Jong, S. (2004). Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 52, 821-831.
- Stark, A.K., Sriskantharajah, S., Hessel, E.M., and Okkenhaug, K. (2015). PI3K inhibitors in inflammation, autoimmunity and cancer. *Curr Opin Pharmacol* 23, 82-91.
- Stary, G., Klein, I., Kohlhöfer, S., Koszik, F., Scherzer, T., Mullauer, L., Quendler, H., Kohrgruber, N., and Stingl, G. (2009). Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4+ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients. *Blood* 114, 3854-3863.
- Stephens, B., and Handel, T.M. (2013). Chemokine receptor oligomerization and allostery. *Progress in molecular biology and translational science* 115, 375-420.
- Stetson, D.B., and Medzhitov, R. (2006). Type I interferons in host defense. *Immunity* 25, 373-381.
- Strachan, D.P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299, 1259-1260.
- Strober, W., Murray, P.J., Kitani, A., and Watanabe, T. (2006). Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 6, 9-20.
- Sun, K., and Metzger, D.W. (2008). Inhibition of pulmonary antibacterial defense by interferon-gamma during recovery from influenza infection. *Nat Med* 14, 558-564.
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 339, 786-791.
- Swiecki, M., and Colonna, M. (2015). The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 15, 471-485.
- Tabarean, I.V. (2015). Histamine receptor signaling in energy homeostasis. *Neuropharmacology*.
- Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S., et al. (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393, 591-594.



- Taieb, J., Chaput, N., Menard, C., Apetoh, L., Ullrich, E., Bonmort, M., Pequignot, M., Casares, N., Terme, M., Flament, C., et al. (2006). A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med* 12, 214-219.
- Taylor, P., Tamura, T., Kong, H.J., Kubota, T., Kubota, M., Borghi, P., Gabriele, L., and Ozato, K. (2007). The feedback phase of type I interferon induction in dendritic cells requires interferon regulatory factor 8. *Immunity* 27, 228-239.
- Takahashi, H.K., Iwagaki, H., Mori, S., Yoshino, T., Tanaka, N., and Nishibori, M. (2004). Histamine inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin (IL)-18 production in human monocytes. *Clin Immunol* 112, 30-34.
- Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T.W., and Taniguchi, T. (2005). Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434, 243-249.
- Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21, 335-376.
- Takeda, K., Smyth, M.J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Yamaguchi, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2001). Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. *Cell Immunol* 214, 194-200.
- Tan, W., Martin, D., and Gutkind, J.S. (2006). The Galpha13-Rho signaling axis is required for SDF-1-induced migration through CXCR4. *J Biol Chem* 281, 39542-39549.
- Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., and Tanaka, N. (2001). IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annual Review of Immunology* 19, 623-655.
- Tanji, H., Ohto, U., Shibata, T., Miyake, K., and Shimizu, T. (2013). Structural reorganization of the Toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands. *Science* 339, 1426-1429.
- Tassone, L., Moratto, D., Vermi, W., De Francesco, M., Notarangelo, L.D., Porta, F., Lougaris, V., Facchetti, F., Plebani, A., and Badolato, R. (2010). Defect of plasmacytoid dendritic cells in warts, hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome patients. *Blood* 116, 4870-4873.
- Teicher, B.A., and Fricker, S.P. (2010). CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 16, 2927-2931.
- Teijaro, J.R., Ng, C., Lee, A.M., Sullivan, B.M., Sheehan, K.C., Welch, M., Schreiber, R.D., de la Torre, J.C., and Oldstone, M.B. (2013). Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science* 340, 207-211.
- Tel, J., Aarntzen, E.H., Baba, T., Schreiber, G., Schulte, B.M., Benitez-Ribas, D., Boerman, O.C., Croockewit, S., Oyen, W.J., van Rossum, M., et al. (2013). Natural human plasmacytoid dendritic cells induce antigen-specific T-cell responses in melanoma patients. *Cancer Res* 73, 1063-1075.
- Tel, J., Smits, E.L., Anguille, S., Joshi, R.N., Figdor, C.G., and de Vries, I.J. (2012). Human plasmacytoid dendritic cells are equipped with antigen-presenting and tumoricidal capacities. *Blood* 120, 3936-3944.
- Teles, R.M., Graeber, T.G., Krutzik, S.R., Montoya, D., Schenk, M., Lee, D.J., Komisopoulou, E., Kelly-Scumpia, K., Chun, R., Iyer, S.S., et al. (2013). Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses. *Science* 339, 1448-1453.
- Thoma, G., Streiff, M.B., Kovarik, J., Glickman, F., Wagner, T., Beerli, C., and Zerwes, H.G. (2008). Orally bioavailable isothioureas block function of the chemokine receptor CXCR4 in vitro and in vivo. *J Med Chem* 51, 7915-7920.
- Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinl, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J.L., Schroter, M., et al. (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386, 517-521.
- Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- Thorpe, L.M., Yuzugullu, H., and Zhao, J.J. (2015). PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nature reviews. Cancer* 15, 7-24.
- Tian, J., Avalos, A.M., Mao, S.Y., Chen, B., Senthil, K., Wu, H., Parroche, P., Drabic, S., Golenbock, D., Sirois, C., et al. (2007). Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 8, 487-496.

- Tokarev, A., Suarez, M., Kwan, W., Fitzpatrick, K., Singh, R., and Guatelli, J. (2013). Stimulation of NF-kappaB activity by the HIV restriction factor BST2. *J Virol* 87, 2046-2057.
- Treilleux, I., Blay, J.Y., Bendriss-Vermare, N., Ray-Coquard, I., Bachelot, T., Guastalla, J.P., Bremond, A., Goddard, S., Pin, J.J., Barthelemy-Dubois, C., and Lebecque, S. (2004). Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 10, 7466-7474.
- Trinchieri, G. (2010). Type I interferon: friend or foe? *J Exp Med* 207, 2053-2063.
- Troegeler, A., Lastrucci, C., Duval, C., Tanne, A., Cougoule, C., Maridonneau-Parini, I., Neyrolles, O., and Lugo-Villarino, G. (2014). An efficient siRNA-mediated gene silencing in primary human monocytes, dendritic cells and macrophages. *Immunology and cell biology*.
- Troutman, T.D., Bazan, J.F., and Pasare, C. (2012). Toll-like receptors, signaling adapters and regulation of the pro-inflammatory response by PI3K. *Cell Cycle* 11, 3559-3567.
- Tsai, W.P., Nara, P.L., Kung, H.F., and Oroszlan, S. (1990). Inhibition of human immunodeficiency virus infectivity by chloroquine. *AIDS Res Hum Retroviruses* 6, 481-489.
- Uematsu, S., and Akira, S. (2007). Toll-like receptors and Type I interferons. *J Biol Chem* 282, 15319-15323.
- Uematsu, S., Sato, S., Yamamoto, M., Hirotani, T., Kato, H., Takeshita, F., Matsuda, M., Coban, C., Ishii, K.J., Kawai, T., et al. (2005). Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- $\alpha$  induction. *The Journal of experimental medicine* 201, 915-923.
- Uller, L., Leino, M., Bedke, N., Sammut, D., Green, B., Lau, L., Howarth, P.H., Holgate, S.T., and Davies, D.E. (2010). Double-stranded RNA induces disproportionate expression of thymic stromal lymphopoietin versus interferon-beta in bronchial epithelial cells from donors with asthma. *Thorax* 65, 626-632.
- Urbonaviciute, V., and Voll, R.E. (2011). High-mobility group box 1 represents a potential marker of disease activity and novel therapeutic target in systemic lupus erythematosus. *J Intern Med* 270, 309-318.
- van der Pouw Kraan, T.C., Sniijders, A., Boeiije, L.C., de Groot, E.R., Alewijnse, A.E., Leurs, R., and Aarden, L.A. (1998). Histamine inhibits the production of interleukin-12 through interaction with H2 receptors. *J Clin Invest* 102, 1866-1873.
- van Grevenynghe, J., Cubas, R.A., Noto, A., DaFonseca, S., He, Z., Peretz, Y., Filali-Mouhim, A., Dupuy, F.P., Procopio, F.A., Chomont, N., et al. (2012). Loss of memory B cells during chronic HIV infection is driven by Foxo3a- and TRAIL-mediated apoptosis. *J Clin Invest* 121, 3877-3888.
- Verthelyi, D., Ishii, K.J., Gursel, M., Takeshita, F., and Klinman, D.M. (2001). Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J Immunol* 166, 2372-2377.
- Vigerust, D.J., and McCullers, J.A. (2007). Chloroquine is effective against influenza A virus in vitro but not in vivo. *Influenza and other respiratory viruses* 1, 189-192.
- Villadangos, J.A., and Young, L. (2008). Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 29, 352-361.
- Vincent, M.J., Bergeron, E., Benjannet, S., Erickson, B.R., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Seidah, N.G., and Nichol, S.T. (2005). Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. *Virology journal* 2, 69.
- Vogt, C.I. (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). Jent & Gassmann.
- Vollmer, J., Tluk, S., Schmitz, C., Hamm, S., Jurk, M., Forsbach, A., Akira, S., Kelly, K.M., Reeves, W.H., Bauer, S., and Krieg, A.M. (2005). Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J Exp Med* 202, 1575-1585.
- Vucic, D., Dixit, V.M., and Wertz, I.E. (2011). Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 439-452.
- Walczak, H., Degli-Esposti, M.A., Johnson, R.S., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Boiani, N., Timour, M.S., Gerhart, M.J., Schooley, K.A., Smith, C.A., et al. (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *Embo J* 16, 5386-5397.

- Wandinger, K.P., Lunemann, J.D., Wengert, O., Bellmann-Strobl, J., Aktas, O., Weber, A., Grundstrom, E., Ehrlich, S., Wernecke, K.D., Volk, H.D., and Zipp, F. (2003). TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Lancet* 361, 2036-2043.
- Wang, L., Tassioulas, I., Park-Min, K.H., Reid, A.C., Gil-Henn, H., Schlessinger, J., Baron, R., Zhang, J.J., and Ivashkiv, L.B. (2008). 'Tuning' of type I interferon-induced Jak-STAT1 signaling by calcium-dependent kinases in macrophages. *Nat Immunol* 9, 186-193.
- Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & development* 15, 2922-2933.
- Wathelet, M.G., Lin, C.H., Parekh, B.S., Ronco, L.V., Howley, P.M., and Maniatis, T. (1998). Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Mol Cell* 1, 507-518.
- Watts, A.O., van Lipzig, M.M., Jaeger, W.C., Seeber, R.M., van Zwam, M., Vinet, J., van der Lee, M.M., Siderius, M., Zaman, G.J., Boddeke, H.W., et al. (2013). Identification and profiling of CXCR3-CXCR4 chemokine receptor heteromer complexes. *British journal of pharmacology* 168, 1662-1674.
- Weber, A., Wandinger, K.P., Mueller, W., Aktas, O., Wengert, O., Grundstrom, E., Ehrlich, S., Windemuth, C., Kuhlmann, T., Wienker, T., et al. (2004). Identification and functional characterization of a highly polymorphic region in the human TRAIL promoter in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 149, 195-201.
- Wendland, M., Czeloth, N., Mach, N., Malissen, B., Kremmer, E., Pabst, O., and Forster, R. (2007). CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6347-6352.
- Whalen, E.J., Rajagopal, S., and Lefkowitz, R.J. (2011). Therapeutic potential of beta-arrestin- and G protein-biased agonists. *Trends in molecular medicine* 17, 126-139.
- Wietek, C., Miggin, S.M., Jefferies, C.A., and O'Neill, L.A. (2003). Interferon regulatory factor-3-mediated activation of the interferon-sensitive response element by Toll-like receptor (TLR) 4 but not TLR3 requires the p65 subunit of NF-kappa. *J Biol Chem* 278, 50923-50931.
- Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A., and et al. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673-682.
- Wilkinson, R.A., Pincus, S.H., Shepard, J.B., Walton, S.K., Bergin, E.P., Labib, M., and Teintze, M. (2011). Novel compounds containing multiple guanide groups that bind the HIV coreceptor CXCR4. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 255-263.
- Wilkinson, R.A., Pincus, S.H., Song, K., Shepard, J.B., Weaver, A.J., Jr., Labib, M.E., and Teintze, M. (2013). Improved guanide compounds which bind the CXCR4 co-receptor and inhibit HIV-1 infection. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 23, 2197-2201.
- Wilson, E.B., Yamada, D.H., Elsaesser, H., Herskovitz, J., Deng, J., Cheng, G., Aronow, B.J., Karp, C.L., and Brooks, D.G. (2013). Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science* 340, 202-207.
- Woelk, C.H., Frost, S.D., Richman, D.D., Higley, P.E., and Kosakovsky Pond, S.L. (2007). Evolution of the interferon alpha gene family in eutherian mammals. *Gene* 397, 38-50.
- Wu, B., Chien, E.Y., Mol, C.D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F.C., et al. (2010). Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 330, 1066-1071.
- Wu, G.S., Burns, T.F., Zhan, Y., Alnemri, E.S., and El-Deiry, W.S. (1999). Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor. *Cancer Res* 59, 2770-2775.
- Wu, L., Feng, B.S., He, S.H., Zheng, P.Y., Croitoru, K., and Yang, P.C. (2007). Bacterial peptidoglycan breaks down intestinal tolerance via mast cell activation: the role of TLR2 and NOD2. *Immunol Cell Biol* 85, 538-545.

- Wu, L., and KewalRamani, V.N. (2006). Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* 6, 859-868.
- Wurbel, M.A., McIntire, M.G., Dwyer, P., and Fiebiger, E. (2011). CCL25/CCR9 interactions regulate large intestinal inflammation in a murine model of acute colitis. *PLoS One* 6, e16442.
- Xu, L.G., Wang, Y.Y., Han, K.J., Li, L.Y., Zhai, Z., and Shu, H.B. (2005). VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* 19, 727-740.
- Yan, N., and Chen, Z.J. (2012). Intrinsic antiviral immunity. *Nat Immunol* 13, 214-222.
- Yanai, H., Ban, T., Wang, Z., Choi, M.K., Kawamura, T., Negishi, H., Nakasato, M., Lu, Y., Hangai, S., Koshiba, R., et al. (2009). HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature* 462, 99-103.
- Yang, K., Puel, A., Zhang, S., Eidenschenk, C., Ku, C.L., Casrouge, A., Picard, C., von Bernuth, H., Senechal, B., Plancoulaine, S., et al. (2005). Human TLR-7-, -8-, and -9-mediated induction of IFN-alpha/beta and -lambda is IRAK-4 dependent and redundant for protective immunity to viruses. *Immunity* 23, 465-478.
- Yasuda, K., Rutz, M., Schlatter, B., Metzger, J., Lippa, P.B., Schmitz, F., Haas, T., Heit, A., Bauer, S., and Wagner, H. (2006). CpG motif-independent activation of TLR9 upon endosomal translocation of "natural" phosphodiester DNA. *Eur J Immunol* 36, 431-436.
- Yi, C.H., and Yuan, J. (2009). The Jekyll and Hyde functions of caspases. *Developmental cell* 16, 21-34.
- Yoneyama, M., and Fujita, T. (2004). [Virus-induced expression of type I interferon genes]. *Uirusu* 54, 161-167.
- Yoneyama, M., and Fujita, T. (2009). RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunol Rev* 227, 54-65.
- Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Fukuda, M., Nishida, E., and Fujita, T. (1998). Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J* 17, 1087-1095.
- Yoo, E., Salunke, D.B., Sil, D., Guo, X., Salyer, A.C., Hermanson, A.R., Kumar, M., Malladi, S.S., Balakrishna, R., Thompson, W.H., et al. (2014). Determinants of activity at human Toll-like receptors 7 and 8: quantitative structure-activity relationship (QSAR) of diverse heterocyclic scaffolds. *J Med Chem* 57, 7955-7970.
- Yoshizaki, M., Tazawa, A., Kasumi, E., Sasawatari, S., Itoh, K., Dohi, T., Sasazuki, T., Inaba, K., Makrigiannis, A.P., and Toyama-Sorimachi, N. (2009). Spatiotemporal regulation of intracellular trafficking of Toll-like receptor 9 by an inhibitory receptor, Ly49Q. *Blood* 114, 1518-1527.
- Yu, J.W., Jeffrey, P.D., and Shi, Y. (2009). Mechanism of procaspase-8 activation by c-FLIPL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8169-8174.
- Yu, S.L., Wong, C.K., Wong, P.T., Chen, D.P., Szeto, C.C., Li, E.K., and Tam, L.S. (2011). Down-regulated NOD2 by immunosuppressants in peripheral blood cells in patients with SLE reduces the muramyl dipeptide-induced IL-10 production. *PLoS One* 6, e23855.
- Yuan, J., and Kroemer, G. (2010). Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes & development* 24, 2592-2602.
- Zahn, S., Rehkemper, C., Ferring-Schmitt, S., Bieber, T., Tuting, T., and Wenzel, J. (2011). Interferon-alpha stimulates TRAIL expression in human keratinocytes and peripheral blood mononuclear cells: implications for the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. *Br J Dermatol* 165, 1118-1123.
- Zaslhoff, M., Adams, A.P., Beckerman, B., Campbell, A., Han, Z., Luijten, E., Meza, I., Julander, J., Mishra, A., Qu, W., et al. (2011). Squalamine as a broad-spectrum systemic antiviral agent with therapeutic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 15978-15983.
- Zelenay, S., Elias, F., and Flo, J. (2003). Immunostimulatory effects of plasmid DNA and synthetic oligodeoxynucleotides. *Eur J Immunol* 33, 1382-1392.
- Zhan, Y., Carrington, E.M., Ko, H.J., Vikstrom, I.B., Oon, S., Zhang, J.G., Vremec, D., Brady, J.L., Bouillet, P., Wu, L., et al. (2015). Bcl-2 antagonists kill plasmacytoid dendritic cells from lupus-prone mice and dampen interferon-alpha production. *Arthritis Rheumatol* 67, 797-808.

- Zhang, C., Li, J., Han, Y., and Jiang, J. (2015). A meta-analysis for CXCR4 as a prognostic marker and potential drug target in non-small cell lung cancer. *Drug design, development and therapy* 9, 3267-3278.
- Zhang, G. (2004). Tumor necrosis factor family ligand-receptor binding. *Current opinion in structural biology* 14, 154-160.
- Zhang, H., Tay, P.N., Cao, W., Li, W., and Lu, J. (2002). Integrin-nucleated Toll-like receptor (TLR) dimerization reveals subcellular targeting of TLRs and distinct mechanisms of TLR4 activation and signaling. *FEBS Lett* 532, 171-176.
- Zhang, M., Borovikova, L.V., Wang, H., Metz, C., and Tracey, K.J. (1999). Spermine inhibition of monocyte activation and inflammation. *Mol Med* 5, 595-605.
- Zhang, X.D., Franco, A.V., Nguyen, T., Gray, C.P., and Hersey, P. (2000). Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells. *J Immunol* 164, 3961-3970.
- Zhao, H.G., L.; Zhao, H.; Zhao, J.; Hao Weng, H.; and Zhao, B. (2014). CXCR4 over-expression and survival in cancer: A system review and meta-analysis. *Oncotarget* 6.
- Zitvogel, L., Galluzzi, L., Kepp, O., Smyth, M.J., and Kroemer, G. (2015). Type I interferons in anticancer immunity. *Nat Rev Immunol* 15, 405-414.
- Zou, W., Borvak, J., Wei, S., Isaeva, T., Curiel, D.T., and Curiel, T.J. (2001a). Reciprocal regulation of plasmacytoid dendritic cells and monocytes during viral infection. *Eur J Immunol* 31, 3833-3839.
- Zou, W., Machelon, V., Coulomb-L'Hermin, A., Borvak, J., Nome, F., Isaeva, T., Wei, S., Krzysiek, R., Durand-Gasselin, I., Gordon, A., et al. (2001b). Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 7, 1339-1346.
- Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D.R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595-599.
- Zucchini, N., Bessou, G., Robbins, S.H., Chasson, L., Raper, A., Crocker, P.R., and Dalod, M. (2008). Individual plasmacytoid dendritic cells are major contributors to the production of multiple innate cytokines in an organ-specific manner during viral infection. *Int Immunol* 20, 45-56.



## RÉSUMÉ

Les pDC représentent la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes et établissent le lien essentiel entre l'immunité innée et adaptative. Les pDC endocytent et détruisent les particules virales et ainsi détectent leur matériel génétique grâce à des senseurs antiviraux de la famille des Toll-Like Receptors (TLR). L'activation des TLR7/9 induit la production massive d'interféron de type I (IFN-I), un antiviral puissant indispensable au contrôle de la propagation virale lors des phases aiguës de l'infection. Cependant, l'IFN-I peut s'avérer avoir des effets délétères dans un grand nombre d'infections chroniques et de maladies auto-immunes. Ainsi, il semble indispensable de découvrir les mécanismes régulateurs des pDC ainsi que des modulateurs de l'activation des pDC.

Nous avons ainsi montré que les monoamines (histamine, dopamine, sérotonine) et les polyamines (spermine et spermidine) inhibent l'activation complète des pDC stimulées par divers virus. Par la suite, nous avons identifié CXCR4 comme étant le récepteur des amines sur les pDC. Ainsi nous avons pu montrer que les amines pouvaient réguler les pDC en passant par CXCR4 et que ce récepteur était un interrupteur d'activation potentiel des pDC lors des infections virales. Afin de comprendre le mécanisme des amines, nous avons développé une nouvelle technologie : la transfection de siRNA dans les pDC primaires humaines.

D'autre part, nous avons détecté des cellules géantes multinucléées en forme de « roue de bicyclette » lorsque les pDC sont cultivées *in vitro* avec de grandes quantités de virus VIH. Ainsi, comme les monocytes et les macrophages, les pDC peuvent former *in vitro* des cellules géantes multinucléées exprimant de hauts niveaux de protéines virales p24 de VIH-1. Cependant, les pDC ne sont que très peu infectées (moins de 5%). Nous nous sommes alors demandé si le corécepteur CXCR4 du virus VIH était aussi important que le récepteur CD4 pour la reconnaissance de ce dernier lors de l'activation des pDC.

**Mots Clés :** cellules dendritiques plasmacytoïdes, interféron de type I, amines, CXCR4, siRNA

---

## ABSTRACT

pDC are the first line of defense of our organism against pathogens and establish the essential link between the innate and adaptive immunity. pDC endocytose and destroy the viral particles and thus, detect the genetic material with their antiviral sensors from the Toll-Like Family (TLR). The activation of TLR7/9 induces massive production of type I interferon (IFN-I), a powerful antiviral molecule, essential to control viral propagation during the acute phases of the infection. However, type I IFN can have deleterious effects in a large number of chronic infections and autoimmune diseases. Thus, it seems essential to discover the regulatory mechanism of pDC as well as pDC activation modulators.

We showed that monoamines (histamine, dopamine and serotonin) and polyamines (spermine and spermidine) inhibit completely the activation of virus-stimulated pDC. Thus, we showed that amines regulated pDC activation through CXCR4 engagement and that this receptor was a potential switch "on-off" for pDC during viral infections. To better understand the mechanism of action by which amines inhibit pDC activation, we developed a new technology: siRNA transfection in human primary pDC.

Furthermore, we detected multinuclear giant cells bearing the shape of a bicycle wheel when pDC are cultured *in vitro* with high quantities of HIV virus. Thus, on top of monocytes and macrophages, pDC can form *in vitro* multinuclear giant cells with high levels of p24 viral protein of HIV-1. However, pDC barely get infected (less than 5%). We then wondered if the receptors and co-receptors of the virus were important for the viral recognition during HIV-activation of pDC.

**Key Words :** plasmacytoid dendritic cells, type I interferon, amines, CXCR4, siRNA