HAL
open science

Caractérisation des étapes précoces de l'entrée du VIH-1 dans les cellules dendritiques

Laure Papin

To cite this version:

Laure Papin. Caractérisation des étapes précoces de l'entrée du VIH-1 dans les cellules dendritiques. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONTT030 . tel-01684252

HAL Id: tel-01684252

https://theses.hal.science/tel-01684252

Submitted on 15 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 POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biolologie Cellulaire

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM)

Caractérisation des étapes précoces de l'entrée du VIH-1 dans les cellules dendritiques

Présentée par Laure PAPIN
Le 08 SEPTEMBRE 2017

Sous la direction de Fabien BLANCHET

Devant le jury composé de

Harald Wodrich, CR1, MFP, Bordeaux,	Rapporteur
Ali Amara, DR2, Institut Universitaire d'Hématologie, Paris,	Rapporteur
Clarisse Berlioz-Torrent, DR2, Institut Cochin, Paris	Examinatrice
Nathalie Chazal, MCF, IRIM, Montpellier,	Examinatrice
Cécile Gauthier-Rouvière, DR1, CRBM, Montpellier,	Présidente du jury

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

RESUME DE LA THESE EN FRANÇAIS

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine de type I (VIH-1) est majoritairement dégradé dans les cellules dendritiques dès son entrée. Des travaux précédemment réalisés dans l'équipe montrent que le mécanisme de l'autophagie contribue à la dégradation virale (virophagie) et promeut les réponses immunitaires innées et adaptatives. Etant donné que cette virophagie est par la suite inhibée par le virus dans les cellules dendritiques, mieux comprendre la mise en place de cette autophagie antivirale est primordial afin de pouvoir favoriser et surtout stabiliser les défenses cellulaires. Mes résultats de thèse montrent que DC-SIGN, un récepteur lectine de type C (CLR) qui reconnait des carbohydrates mannosylés ou fucosylés, pourrait être impliqué dans la mise en place de cette autophagie antivirale. Ainsi, mes résultats montrent qu'après reconnaissance du VIH-1, ce récepteur induit l'autophagie et interagit rapidement avec plusieurs protéines autophagiques dont certaines impliquées dans les voies endosomales. En effet, mes résultats montrent pour la première fois l'association de la protéine Atg9 avec le récepteur DC-SIGN internalisé. La protéine Atg9 est un facteur essentiel de l'initiation de la voie autophagique régulant notamment l'apport de membranes issues de la membrane plasmique pour la nucléation de vésicules liées à la voie autophagique. D'autre part, après une étude par spectrométrie de masse de l'interactome du récepteur DC-SIGN internalisé, mes résultats montrent qu'une E3 ligase faisant partie de la famille des TRIM, TRIM25, est recrutée lors de l'endocytose du récepteur. Cette protéine a été rapportée comme étant impliquée dans la régulation des réponses innées antivirales issues du récepteur de reconnaissance de pathogène (PRR) RIG-I suggérant une fonction essentielle de TRIM25 dans les réponses immunes innées. De manière intéressante, certains membres de la famille TRIM ont été montrés récemment comme étant essentiels pour l'induction d'une forme d'autophagie sélective parfois antivirale, l'autophagie de précision. Dans ce sens, nous montrons qu'un complexe est formé entre le récepteur DC-SIGN, Atg9, TRIM25 et LC3 suggérant que l'autophagie mise en place très tôt lors de l'engagement du récepteur DC-SIGN pourrait s'avérer être sélective. L'ensemble de ces éléments constitue une première étape pour une meilleure compréhension des étapes précoces de l'entrée du VIH-1 dans les cellules dendritiques avec la caractérisation d'une virophagie sélective induite lors de l'engagement d'un récepteur de l'immunité innée et qui représente une cible particulièrement intéressante afin d'améliorer certaines stratégies thérapeutiques développées actuellement.

ENGLISH ABSTRACT

The Human Immunodeficiency Virus type I (HIV-1) is mostly degraded in dendritic cells as soon as it enters. Previous work in the team shows that the mechanism of autophagy contributes to viral degradation (virophagy) and promotes innate and adaptive immune responses. Since this virophagy is subsequently inhibited by the virus in dendritic cells, a better understanding of the implementation of this antiviral autophagy is essential in order to promote and above all stabilize cellular defenses. My PhD results shows that DC-SIGN, a C-type lectin receptor (CLR) that recognizes mannosylated or fucosylated carbohydrates, may be involved in the development of this antiviral autophagy. Thus, my PhD results shows that after recognition of HIV-1, this receptor induces autophagy and interacts rapidly with several autophagic proteins, some of which are involved in the endosomal pathways. Indeed, my PhD results shows for the first time the association of the protein Atg9 with the internalized DC-SIGN receptor. The Atg9 protein is an essential factor in the initiation of the autophagic pathway regulating in particular the supply of membranes originating from the plasma membrane for the nucleation of vesicles linked to the autophagic pathway. On the other hand, after a mass spectrometric study of the internalized DC-SIGN receptor interbody, my PhD results shows that an E3 ligase belonging to the TRIM family, TRIM25, is recruited during endocytosis of the receptor. This protein has been reported to be involved in the regulation of antiviral innate responses from the RIG-I pathogen recognition receptor suggesting an essential function of TRIM25 in innate immune responses. Interestingly, some members of the TRIM family have recently been shown to be essential for the induction of a form of selective autophagy, sometimes antiviral, precision autophagy. In this sense, we show that a complex is formed between the DC-SIGN, Atg9, TRIM25 and LC3 suggesting that autophagy early on engagement of the DC-SIGN receptor could be selective. All these elements constitute a first step for a better understanding of the early stages of the entry of HIV-1 into dendritic cells with the characterization of a selective virophagy induced when a receptor of the innate immunity And which represents a particularly interesting target in order to improve certain therapeutic strategies currently being developed.

REMERCIEMENTS

Jury et de comité de thèse :
-Je tiens à adresser mes sincères remerciements aux membres de mon jury pour m'avoir fait l'honneur de bien vouloir lire et évaluer mon travail de thèse. Je remercie mes rapporteurs de thèse, les docteurs Ali Amara et Harald Wodrich qui ont accepté de prendre le temps d'évaluer mon travail de thèse et de m'apporter de précieuses suggestions. Je remercie les docteurs Nathalie Chazal et Clarisse Berlioz-Torrent d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant qu'examinatrice. Enfin, je remercie le docteur Cécile Gauthier-Rouvière qui a accepté de suivre mon travail durant mes deux comités de thèse et pour avoir accepté de bien vouloir présider mon jury de thèse.
-Merci aux membres de mon jury de comité de thèse, docteur Arnaud Moris pour vos conseils très précieux. Antoine Gross, merci pour ton savoir sans limites, ta bienveillance, tes conseils et ta disponibilité.

Laboratoire CPBS/IRIM :
-Bien évidemment, je tiens particulièrement à remercier Fabien Blanchet, mon directeur de thèse. J'ai eu l'honneur d'être ta première stagiaire et ta première étudiante en thèse « officielle » lorsque tu es arrivé au CPBS/IRIM. Non seulement tu m'as tout appris au labo mais en plus tu m'as donné la chance de bénéficier de beaucoup de liberté et créativité durant ces 3 années ½. J'ai aussi eu de la chance de démarrer ma thèse au tout début de ce super projet et ainsi de pouvoir me l'approprier entièrement. On peut vraiment dire que j'ai eu beaucoup de chance de tomber sur toi Fabien ! Merci d'avoir toujours été aussi disponible et à l'écoute pour mes très nombreuses questions. Merci aussi de m'avoir encouragé avec le sourire à d'indénombrables reprises lorsque les mannips' ne marchaient pas. C'est rare d'avoir un chef aussi bienveillant et pédagogue. Donc un très GRAND MERCI POUR TOUT !
-Un grand merci à Véro, qui est vraiment le cœur de cette équipe « autophagie et infections ». Tu m'auras été d'une grande aide tout au long de ma thèse et surtout en dernière année quand les deadlines étaient serrés, merci pour la relecture et la correction des (beaucoup trop nombreuses) fautes d'orthographe. Tu es toujours là pour discuter, nous faire rêver avec tes voyages magnifiques et aider tout le monde avec beaucoup de bienveillance, vraiment merci pour ça. Et comme je le dis souvent aux nouveaux « nous on a de la chance on a Véro, elle sait tout ! ».
-Merci à Martine et Lucile pour vos conseils très avisés sur l'autophagie et votre enthousiasme au quotidien. Ce n'est pas donné à tout le monde de bénéficier de conseils d'autophagiste renommées !
-Je tiens à remercier très chaleureusement Christian qui fut pour moi autant un collègue qu'un ami précieux dans cette aventure qu'est la thèse, quelle bouffée d'oxygène quand tu es arrivé au CPBS à mi-parcours ! Quel plaisir de te retrouver ! On aura bien rigolé pendant nos trop peu nombreuses pauses café. D'ailleurs, j'aurais aimé ajouter ton expression pour dire « tâter le terrain » mais cela ne serait pas convenable. Je te souhaite de réussir (c'est déjà fait même si tu ne le vois pas) et beaucoup de bonheur avec Aurélien.
-Ensuite, Ghizlane ! La meilleure surprise de cette dernière année de thèse, c'est tellement dommage que tu ne sois pas arrivé plus tôt, mais on aura bien échangé/rigolé quand même, malgré le timing ultra serré et nos emplois du temps de ministre. Qu'est ce que ça fait du bien de se sentir comprise, d'échanger longuement sur nos projets, de se donner pleins idées et de conseils ! Déjà une grande scientifique et j'ai toute confiance pour toi pour la suite, en tout cas je ne te souhaite que le meilleur.
-Mathilde, même si on ne se sera pas beaucoup fréquentées on aura bien rigolé, je te remercie d'avoir partagé notre minuscule bureau et je te souhaite beaucoup de courage pour la fin de ta thèse (ouuuhhh la rédaction…) et pour la suite de ta carrière qui, j'en suis sure, sera très fructueuse.
-Merci aux doc' et post-doc' de l'actuel IRIM. Rémi, Mar et Daouda avec qui on a formé une super team de jeunes chercheurs financés par Sidaction. Merci Mar pour ta gentillesse et ta douceur, toujours un mot gentil au détours d'un couloir.
-Merci à tout les membres de l'IRIM, notamment à la direction d'avoir bien voulu me laisser organiser 3 collectes de fond très fructueuses au profit de l'association Sidaction.

Sidaction et Université de Montpellier :
-Merci à l'association Sidaction d'avoir financé mes 3 années de thèse. Être financé par cette association a été pour moi une véritable source de motivation. J'ai eu comme l'impression de faire partie d'une petite famille de chercheurs passionnés. Toutes les expériences que j'ai eu l'opportunité de vivre grâce à Sidaction m'ont à chaque fois permis de m'ouvrir l'esprit, de découvrir d'autres disciplines, d'autres champs d'action et me rendre compte qu'au final tant de chemin à été parcouru pour vaincre le fléau VIH/SIDA mais qu'il n'y a qu'en s'unissant et en travaillant sur l'interdisciplinarité qu'une solution parviendra à faire surface. Vraiment, merci à Sidaction de m'avoir permis de participer à l'UJC qui était une expérience extrêmement enrichissante.
-Un grand merci à Bruno Touraine et aux membre du bureau du département Bio-MV de m'avoir permis d'être la toute première représentante des doctorants avec MCE en biologie. Au début cela m'aura demandé beaucoup de travail mais ce fut un travail fructueux qui m'apporta beaucoup de reconnaissance et dont je suis très fière aujourd'hui.
-Merci à Marie-Hélène Boyer et Yannick Simonin de m'avoir guidé et confié 192H d'enseignements en microbiologie ce fut un réel plaisir. Et merci Yannick d'avoir enfin décidé d'épargner nos futurs L1 du maudit cercle roulant !

Collaborations :
-Merci à la plateforme MRI, notamment Serge Urbach et Edith Demettre pour votre professionnalisme et votre gentillesse.
-Merci Aymeric Nerey pour les expériences de microscopie électronique et pour ta disponibilité.
-Merci au docteur Martin Lehmann pour la super-résolution.

Mes « stagiaires » :
-Merci à toutes mes « stagiaires » !! Entre guillemets car certaines sont bien plus que des stagiaires pour moi ! Chronologiquement (et historiquement) Lucille, ma double stagiaire quand j'étais en M1 et en 2ème année de thèse, pour ne citer qu'une de nos anecdotes, on aura bien galéré à aller à deux sur mon scooter à l'IGH pour préparer mes échantillons de protéomique… Attention aux kératines et au grinch. Je suis super contente d'être bientôt dans la même ville que toi ! Je suis sûre que tu deviendras une grande autophagiste ! Sixtine, pas vraiment ma stagiaire mais vraiment devenue une bonne copine via le labo, vive Clément et ses blagues sur les yorkshires. Justine, super rencontre, on se tient au courant pour les remerciements de ton papier… ahah non mais vraiment merci pour ta participation à mon projet de thèse, tu es vraiment arrivée quand j'avais le plus besoin d'aide et tu as accomplis bien plus que ton projet de stage ! Je suis certaine que tu auras une brillante carrière dans ce qu'il te plaira. Et Marjo… qu'elle stagiaaaaaire ahah!

On en vient donc aux amis :
-Marjo, je suis si triste de te quitter en quittant Montpellier, ce n'est pas un merci mais des merci puissance l'infinie qu'il me faudrait pour toi. J'ai beaucoup de peine de réaliser qu'à partir de maintenant on va être loin l'une de l'autre. Mais comme tu le dis si bien, on est des soeuws on s'aime trop, donc ça ne changera rien !
-Merci à Ariane pour nos fous-rire quotidien sur snapchat en espérant que le filtre vieux papi revienne ! Et ne t'inquiète pas je continuerais même si Ben sera dans le coin.
-Merci à Alizée toujours présente depuis Nantes, bientôt 10 ans, Alizée ou le symbole de toutes mes année étudiantes (sans commentaires).
-Merci à Pierre, el canardo de son petit nom, notamment pour nos déjeunés-bouffée d'air frais à la cantine (ou moins frais au RU) pendant ces 3 ans.
-Inès, j'ai hâte de te rejoindre à la capitale (et oui nous les petites Vendéenne), merci pour tes conseils toujours bénéfiques et avisés.
-Nico, j'ai l'impression que l'on boss en binôme depuis maintenant 5 ans ! Sérieusement qui aurait pu croire qu'on enseignerait ensemble pendant 3 ans… Merci d'avoir été là et de me faire partager les aléas de ton aventure de thèsard-papa-mari ! Bientôt à Paris ensemble, je serais là pour tes futurs coups de mous loin de Montpellier, comme toi tu as été là pour moi.
Bref, **les gars : merci mais vraiment M.E.R.C.I** à tous du fond du cœur, c'est un peu votre victoire aussi cette thèse, clairement vous serez tous un peu diplômés en même temps que moi ! Je vous remercie mes amis et proches de m'avoir écoutée, épaulée et rassurée.

En soutenant cette thèse c'est la fin d'une grande aventure, c'est aussi la fin de ma vie étudiante et de ma vie de Montpelliéraine, depuis 8 ans maintenant on peut vraiment dire que Montpellier et moi nous nous étions adoptées. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, avoir accumulé les petits boulots comme une acharnée pour payer mon loyer et vivre durant tout mon cursus universitaire m'aura aidé et forgé. Et sincèrement, un merci aussi aux gens qui n'ont jamais cru en moi, qui m'ont toujours descendue malgré leur totale ignorance de ma vie, de ce que je suis, de mon parcours et de tout ce par quoi je suis passée pour en arriver là, vous avez, à votre insu, été une source inattendue de motivation !

J'en arrive aux plus important. Merci à mon amoureux, Ben, qui a subi, appelons un chat un chat, oui enduré cette thèse à cause de moi, pour et avec moi ! On devrait, à toi aussi, te donner un diplôme pour réussir à me supporter au fil des années ! J'ai hâte de commencer **ENFIN** notre vie à deux à Paris, chez nous. Adieu le TGV mensuel, bonjour Paris, la Seine, l'opéra Garnier (private joke). Merci pour tout, ta bienveillance, ton soutien sans failles, pour les heures passées au téléphone, ton humour malgré toi parfois (je rigole en y repensant), et merci à l'infinie ma personne. L'avenir s'annonce très beau et cette fois-ci, on peut arrêter le décompte : **nous y sommes**.

Merci à ma famille. La famille c'est précieux, c'est tout ce que l'on a, ce qui compte le plus. Maman, merci d'avoir fais de moi ce que je suis aujourd'hui en dépis de tout, comme tu as pu. Je suis tellement fière de vous, mon petit frère et de vous mes deux sœurs. Merci d'être ce que vous êtes, merci d'être là pour moi, toujours, même si vous êtes loin (vive la Vendée). On va vite se rapprocher, Niort-Paris ce n'est plus que 3H de train.

Enfin, je dédis l'intégralité de ce travail à mon père. Ma bonne étoile, qui, j'en suis certaine, me guide tous les jours. Tu as toujours rêvé d'être docteur, et bien voilà, je le serai pour toi.

Résumé de la thèse en français **2**
English abstract **3**
Remerciements **4**
Liste des abréviations **9**
Liste des illustrations **11**
Liste des tableaux **11**
Liste des figures de résultats **12**

Introduction **14**
Chapitre A : Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) de type I **15**
1. La découverte du VIH-1, de l'identification de l'agent etiologique à la pandemie 15
1.1. La découverte du Virus de l'Immunodéficience Humaine 15
1.2. La classification du VIH 15
1.3. Les origines phylogénétiques du VIH-1 15
1.4. Transmission du VIH-1 et physiopathologie de l'infection 16
1.5. Pandémie et épidémiologie 17
2. Structure et organisation génomique du VIH-1 18
3. Les étapes précoces du cycle de réplication du VIH-1 20
3.1. L'entrée virale 20
3.2. De l'attachement viral à l'intégration du provirus 20
3.3. Les étapes tardives de l'infection : l'intégration du génome viral et néo-synthèse virale 22
3.4. Réservoirs viraux 24
Chapitre B : Les cellules dendritiques **25**
4. Découverte et origines des cellules dendritiques 25
4.1. Ontogénèse des cellules dendritiques 25
4.2. Les différents sous-types de cellules dendritiques 26
4.2.1. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) 27
4.2.2. Les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) 28
4.2.3. Les cellules de Langerhans (LC) 28
4.2.4. Les cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDC) 29
4.2.5. Modèles de cellules dendritiques 29
5. Les cellules dendritiques, les sentinelles de l'immunité anti-infectieuse 29
5.1. Les cellules dendritiques sont les piliers du maintien de l'homéostasie immunitaire 29
5.2. Le rôle premier des cellules dendritiques : la reconnaissance des signaux de danger 30
5.2.1. Les récepteurs Toll-like (TLR) 30
5.2.2. Les NOD-like récepteurs (NLR) 31
5.2.3. Les RIG-I like recepteurs (RLR) 31
5.2.4. Les récepteurs lectine 32
5.2.4.1. Les galectines 33
5.2.4.2. Les siglec 33
5.2.4.3. Les lectines solubles 33
5.2.4.4. Les récepteurs de la famille des lectines de type C (CLR) 33
5.3. Les récepteurs lectine de type C membranaires 34
5.3.1. Structure 34
5.3.2. Signalisation 35
5.4. Le récepteur DC-SIGN 37
5.4.1. La découverte du récepteur DC-SIGN 37
5.4.2. Expression cellulaire et localisation des cellules exprimant le récepteur DC-SIGN 38
5.4.3. Structure et internalisation (endocytose) 38
5.4.4. Signalisation 40
5.5. Les cellules dendritiques sont des phagocytes capables de capturer et dégrader les pathogènes 44
5.6. Activation, maturation et migration des DC en réponse aux pathogènes 46
5.6.1. La maturation des cellules dendritiques 47
5.6.2. La migration des cellules dendritiques 47
5.7. L'apprêtement et la présentation antigénique 47
5.8. Orientation et polarisation de la réponse immunitaire 49
Chapitre C : Interaction entre les cellules dendritiques et le VIH-1 ..... **51**
6. L'entrée du VIH-1 dans les cellules dendritiques 51
6.1. La susceptibilité des DC à l'infection par le VIH-1 52
6.1.1. La *cis*-infection 52
6.1.2. La maturation influence la susceptibilité des DC à l'infection par le VIH-1 53
6.2. L'entrée du VIH-1 par les récepteurs lectine de type C 53
6.3. L'entrée du VIH-1 par le récepteur DCSIGN 55
6.4. Le VIH-1 est dégradé dans les DC 55

6.5. Echappement viral, le VIH-1 détourne les fonctions de la cellule dendritique 57
6.5.1. La *trans*-infection 57
6.5.2. La synapse virologique 58
6.5.3. L'exocytose de particules virales 60
6.5.4. Un compartiment viral protégeant le VIH-1 dans les mDC 60
7. Défenses antivirales de l'hôte 61
7.1. Les réponses immunitaires innées anti-VIH-1 62
7.1.1. Les récepteurs cellulaires (PRR) reconnaissant la présence du VIH-1 62
7.1.1.1. Les TLR 63
7.1.1.2. RIG-I 63
7.1.2. Les senseurs cytoplasmiques et facteurs de restriction antiviraux 64
7.1.2.1. Durant la décapsidation 65
7.1.2.2. Durant la réplication virale 66
7.1.2.3. Durant le bourgeonnement 68
7.2. Les réponses immunitaires adaptatives des DC anti-VIH-1 69
Chapitre D : L'autophagie anti-infectieuse 71
8. La découverte et la description du mécanisme de l'autophagie 71
9. Les différents sous-types d'autophagie 72
9.1. La macro-autophagie (autophagie) 74
9.1.1. L'initiation 77
9.1.2. La nucléation : formation du phagophore 78
9.1.3. L'élongation 79
9.1.3.1. Le système de conjugaison Atg5-Atg12/Atg16L1 79
9.1.3.2. Le système de conjugaison de la famille Atg8 80
9.1.3.3. La protéine LC3 B 80
9.1.3.4. Le complexe Atg9-Atg2-Atg18 (WIPI) 81
9.1.3.5. L'origine des membranes autophagosomales 82
9.1.3.6. L'amphisome : un croisement entre la voie endosomale et la voie autophagique 83
9.1.3.7. La maturation 84
9.2. La phagocytose associée aux protéines LC3 (LAP), autophagie non canonique 85
10. L'autophagie sélective (AS) 86
10.1. L'autophagie sélective médiée par des récepteurs adaptateurs 87
10.2. La liaison des RA aux membres de la famille Atg8 87
10.3. La liaison cargo - RA : Ubiquitine, galectine 88
10.4. L'autophagie de précision 89
11. L'autophagie anti-infectieuse : la xénophagie 93
11.1. L'autophagie induite par des récepteurs de reconnaissance de pathogènes (PRR) 94
11.1.1. Les TLR 94
11.1.2. Les NLR 95
11.1.3. Les RLR 95
11.1.4. Les CLR 95
11.2. La xénophagie anti-bactérienne 96
11.3. La virophagie 97
11.3.1. Virophagie par autophagie sélective 97
11.3.2. Inhibition des étapes initiales de virophagie 98
11.3.3. Inhibition des étapes tardives de l'autophagie 98
12. La virophagie anti-VIH-1 99
12.1. Les lymphocytes T $CD4^+$ 100
12.2. Les monocytes et macrophages 101
12.3. Les cellules dendritiques 101

Matériel et méthodes 104
1. Culture cellulaire 105
1. Lignées cellulaires et transfection 105
2. Isolation de monocytes à partir de PBMC humaines 105
3. Génération et culture de MDDC 106
4. Etude de l'endocytose du récepteur DC-SIGN 106
2. Production de virus 106
3. Biochimie 107
1. Western blot 107
2. Immunoprécipitation 107
3. Spectrométrie de masse 108
4. Cytométrie en flux 108
1. Etude de l'expression du récepteur DC-SIGN par cytométrie en flux (FACS) 108

5. Biologie moléculaire 108
1. Transformation bactérienne, extraction et purification des plasmides 108
2. Mutagénèse dirigée 109
3. Séquençage et analyse sur banque de données 109
6. Microscopie 110
1. Marquage immunofluorescent 110
2. Microscopie électronique 110
7. Réactifs et anticorps 111
8. Statistiques 111

Contexte scientifique et problematique de mon projet de thèse 112

Résultats 116
1. Mise en place de l'expression et de l'internalisation du récepteur DC-SIGN a l'aide de différent modèles cellulaires et ligands 118
2. L'engagement du récepteur DC-SIGN induit le flux autophagique 121
3. Etude du traffic post-endocytique et recherche d'interactions entre le récepteur DC-SIGN et des protéines autophagiques 124
4. L'entrée du VIH-1 dans les DC induit une forte association entre le récepteur DC-SIGN et Atg9 128
5. Caractérisation des vésicules formées lors de l'endocytose du récepteur dc-sign 130
6. Analyse protéomique de l'intéractome de DC-SIGN 132
7. Le récepteur DC-SIGN s'associe à la protéine TRIM25 134
8. Certain motifs ou résidus cytosoliques du récepteur DC-SIGN sont impliqués dans le recrutement d'Atg9 136
9. Un complexe est formé entre le récepteur DC-SIGN, la protéine Atg9, l'E3 ligase TRIM25 ainsi que les protéines de la famille LC3 138

Discussion et perspectives 142
1. Modèle d'étude de l'entrée du VIH-1 dans les cellules dendritiques : le récepteur DC-SIGN 143
2. L'engagement du récepteur DC-SIGN induit l'autophagie 144
3. Le récepteur DC-SIGN induit le recrutement de la protéine Atg9 durant son endocytose 146
1. Découverte d'une autophagie antivirale localisée à la membrane plasmique ? 147
2. L'endocytose est nécessaire pour le recrutement de la protéine Atg9 lors de l'internalisation du récepteur DC-SIGN 149
4. La protéine TRIM25 s'associe au récepteur DC-SIGN durant son endocytose 151
1. La protéine TRIM25 induit-elle la dégradation du VIH-1 par autophagie de précision ? 152
2. La protéine TRIM25 via son activité E3 ligase régule t'elle spécifiquement la signalisation du récepteur DC-SIGN ? Vers la virophagie ? 154
5. Le complexe DC-SIGN-TRIM25-Atg9-LC3 155
1. Le complexe croise-t-il les protéines du signalosome DC-SIGN ? 155
2. Dégradation du VIH-1 par autophagie sélective dans les DC 156
3. Une autophagie dépendante du récepteur DC-SIGN, applicable à d'autres CLR ? D'autres pathogènes que le VIH-1 ? 157

Conclusion générale 158

Références bibliographiques 164

Annexes 182

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac	Anticorps
ADN/ARN	Acide désoxyribonucléique/ Acide ribonucléique
Ag	Antigène
AMBRA1	Activating molecule in Beclin1-regulated autophagy
AP1/2	Clathrin adaptator protein 1/2
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic
Asp	Protéine Anti-Sens
Atg	Autophagy related gene
ATP	Adenosine triphosphate
Baf A1	Bafilomycin A1
Bcl-2	B cell leukemia/lymphoma 2
BCR	B-cell receptor
BDCA	Blood Dendritic Cell Antigen
Bif-1	Bax-interacting factor 1
BST-2	Tétherine
CA	Capside p24
cDC	Cellule dendritique conventionnelle
cGAS	cGAMP synthesis enzyme
Chq	Chloroquine
CLIP	Class-II associated invariant chain peptide
CLR	C-type letine récepteur
CMA	Chaperone-mediated autophagy
CMH/HLA	Complexe majeur d'histocompatibilité/Human Leucocyte Antigen
CMV	Cytomegalovirus
CNK	
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CRD	domaine de reconnaissance des sucres
CRP	C-reactive protein
CLR	Lectine de type C
CXCR4 / CCR5	Corécepteurs C-X-C chemokine receptor type 4 / C-C chemokine receptor type 5
CypA	Cyclophilin A
DC	Cellule Dendritique
DCIR	Dendritic Cell Immunoreceptor
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intracellular Adhesion Molecules (ICAM)-3 Grabbing Non-Integrin
Dectin	Dendritic cell-associated C-type lectin 1
DFCP1	Double FYVE domain-containing protein 1
dNTP	Désoxyribonucléotides tri-phosphate
DV	Dengue virus
EBV	Epstein Barr virus
Env	La glycoprotéine d'enveloppe virale (complexe gp120/gp41)
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
FIP200	FAK family kinase-interacting protein of 200kDa
GABARAP	GABAA receptor-associated protein
GFP/RFP	Green/Red fluorescent protein
GlcNAc	N-acetylglucosamine
GM-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
gp120/41	Glycoprotéine d'enveloppe 120 / 41
HBV	Hepatitis B virus (virus de l'hépatite B)
HCV	Hepatitis B virus (virus de l'hépatite C)
HDAC6	Histone deacétylase 6
HLA	Human Leucocyte Antigen
hVps34	Human vacuolar protein sorting 34
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
imDC	Cellule Dendritique immature
IN	Intégrase p32
INF 1	Interféron de type I
IRF	Interferon regulatory factors
IRGM	Immunity-related GTPase family M protein
ISG	IFN stimulated genes
KSR1	Kinase suppressor of Ras
LAMP	Lysosome associated membrane protein
LAP	LC3-associated phagocytosis
LB	Lymphocytes B ou plasmocytes
LC	Cellule de Langerhans

LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LPS	Lipopolysaccharide
LSP1	Lymphocyte-Specific Protein 1
LT	Lymphocytes T auxiliaire, Th T-helper
LTR	Séquence terminale longue répétée
MA	Matrice p17
ManLAM	Mannose-capped lipoarabinomannan
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAP-LC3	Microtubule-associated protein light chain 3
MDA-5	melanoma-differentiation-associated gene 5
mDC	Cellule Dendritique mature
MDDC	Cellule dendritique dérivée de monocyte
MR	Mannose receptor
MTB	Mycobacterium tuberculosis
mTOR	Mammalian target of Rapamycin
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NBR1	Neighbor of BRCA1 gene 1
NC	Nucléoprotéine p7
NDP52	Nuclear dot protein of 52 kDA
Nef	Facteur de Régulation Négatif
NF-kB	Nuclear factor kappa-light-chainenhancer of activated B cells
NLR	NOD-like receptor
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
PAS	Pre-autophagosomal structure
PBMC	Cellules mononuclées du sang périphérique
PCD de type I/II	Mort Cellulaire Programmée de type I/II
pDC	Cellule dendritique plasmacytoïde
PE	Phosphatidylethanolamine
PIC	Complexe de pré-intégration
PI3K (III) ou PI3KC3	Phosphatidylinositol-3-kinase (de type III)
PR	Protéase p10
PRR	Pathogen Recognition Receptor
PtdIns3P	Phosphatidylinositol-3-phosphate
Rab	Ras related in Brain
RE	Réticulum endoplasmique
Rev	Régulateur de l'expression viral
RIG-1	Retinoic acid-inducible gene 1
RLR	RIG-I like récepteur
ROS	Reactive oxygen species / dérivés réactifs de l'oxygène
RT	Rétro-transcriptase p66
RUBICON	RUN domain Beclin1-interacting protein
SAMHD1	SAM domain and HD domain 1 protein
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
Siglec-1	Sialic acid binding Ig-like lectin 1
siRNA/shRNA	RNA interference (short hairpin / small interfering)
SV	Synapse virologique
SIV	Virus de l'immunodéficience simienne
SIV	Virus de l'immunodéficience simienne
SLR	Sequestosome 1/p62-like receptors
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
SQSTM1/p62	Sequestosome1 ou p62
Tat	Transactivateur de la transcription virale
TCR	T-cell receptor
TEM	Transmission electron microscopy
TGN	Trans-Golgi network
Th	Lymphocyte T Helper
TLR	Toll like recepteur
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon
TRIM	Tripartite motif-containing protein
UBD / UBA	Ubiquitin-binding domain
ULK1 /2	Unc-51 like autophagy activating kinase 1/2
UPS	Ubiquitin-proteasome system
UVRAG	Irradiation resistance-associated gene
VAMP	Vesicle associated membrane protein
Vif	Protéine Infectivité Virale
VIH-1	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1
Vpr	Protéine Virale R
Vpu	Protéine Virale U
Vpx	Protéine Virale X
VSV	Vesicular stomatitis virus
WIPI	WD repeat domain PtdIns3P interacting protein

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Illustration 1 - Répartition mondiale des populations infectées par le VIH-1 17
Illustration 2 - Représentation schématique de la structure de la particule virale du VIH-1 18
Illustration 3 - Représentation schématique du génome du VIH-1 19
Illustration 4 - Le cycle de multiplication du VIH-1 21
Illustration 5 - Ontogénèse des cellules dendritiques 26
Illustration 6 - Représentation schématique des différents types de lectine 32
Illustration 7 - Représentation schématique de la classification des lectines et d'un récepteur de lectine de type C 34
Illustration 8 - Les différentes voies de signalisations des CLR 36
Illustration 9 - Représentation schématique du récepteur DC-SIGN 39
Illustration 10 - Représentation schématique de la signalisation du récepteur DC-SIGN 41
Illustration 11 - Rôle central des lysosomes dans le devenir des vésicules de dégradation 45
Illustration 12 - Les différentes voies d'entrées du VIH dans les DC 52
Illustration 13 - Transmission virale de virus libres ou entre cellules 59
Illustration 14- Senseurs cytosoliques du VIH 64
Illustration 15 - Les différents rôles de l'autophagie 72
Illustration 16 - Les différents types d'autophagie 73
Illustration 17 - Les étapes de la macro-autophagie 74
Illustration 18 - L'initiation de l'autophagie 77
Illustration 19 - La nucléation : Du recrutement des protéines initiant l'autophagie à la formation du phagophore (PAS) au niveau de l'omégasome 79
Illustration 20 - Les protéines Atg9 et Atg16L1 contribue à l'apport de membranes provenant de la membrane plasmique pour la formation de l'autophagosome 81
Illustration 21 - La contribution de la voie endosomale dans l'autophagie 84
Illustration 22 - A : L'autophagie sélective, B : Les récepteurs de l'autophagie sélective (SLR) 86
Illustration 23 - A : Représentation schématique d'une protéine TRIM, B : L'autophagie de précision : formation d'un TRIMosome 90
Illustration 24 - Relation VIH / autophagie par type cellulaire 99
Illustration 25 – Contexte scientifique de ma thèse 114
Illustration 26 - Problématique de thèse 115
Illustration 27 – Hypothèse d'un flux autophagique localisé à la membrane plasmique 148
Illustration 28 - Théorie sur la virophagie sélective du VIH-1 dans les cellules dendritiques 159

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Les gènes et les protéines du VIH ainsi que leurs principales fonctions 19
Tableau 2 - Caractéristiques discriminantes des sous-types de DC 27
Tableau 3 - Principales lectines impliquées dans la reconnaissance des pathogènes, leur localisation ainsi que leur structure 35
Tableau 4 - Les principaux pathogènes reconnus par DC-SIGN 39
Tableau 5 - Récepteurs lectine de type C exprimées par les cellules dendritiques capable de reconnaître le VIH-1 54
Tableau 6- Les senseurs et facteurs de restriction viraux 62
Tableau 7 - Signification de l'abréviation et rôles des protéines Atg impliquées dans l'autophagie 76
Tableau 8 - Domaines composants les TRIM et leurs fonctions 90
Tableau 9 - Résumé des interactions TRIM - protéines autophagiques 93
Tableau 10 – Liste de plasmides utilisés durant ma thèse 105
Tableau 11 – Liste des anticorps utilisés durant ma thèse 111
Tableau 12 - Questions soulevées par les résultats de thèse 160

LISTE DES FIGURES DE RESULTATS

Figure 1 - Modèle d'internalisation du récepteur DC-SIGN endogène (MDDC primaires) ou exprimé de manière exogène dans des lignées cellulaires (HeLa et THP-1)..... 117
Figure 2 - L'internalisation du récepteur DC-SIGN induit l'autophagie..... 120
Figure 3 - Identification de partenaires autophagiques du récepteur DC-SIGN 123
Figure 4 - Caractérisation des structures formées et de l'association entre DC-SIGN et Atg9 125
Figure 5 - Le récepteur DC-SIGN interagit avec la protéine Atg9 durant l'internalisation du récepteur par le VIH-1 et le ManLAM 127
Figure 6 - Caractérisation des vésicules endocytiques formées lors de l'internalisation de DC-SIGN dans les DC 129
Figure 7 - Analyse du protéome de DC-SIGN par spectrométrie de masse 131
Figure 8 - L'internalisation du récepteur DC-SIGN augmente son association à TRIM25 133
Figure 9 - Certain motifs et résidus cytosoliques du récepteur DC-SIGN sont impliqués dans le recrutement d'Atg9 lors de l'endocytose du récepteur DC-SIGN 135
Figure 10 - Les protéines Atg9, Trim25, LC3 et DC-SIGN forment un complexe de type TRIMosome 137
Figure 11 - L'internalisation du récepteur DC-SIGN induit la formation d'un complexe Atg9-Trim25-LC3-DC-SIGN..... 139
Figure 12 – annexes : 140

INTRODUCTION

CHAPITRE A : LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH) DE TYPE I

1. LA DECOUVERTE DU VIH-1, DE L'IDENTIFICATION DE L'AGENT ETIOLOGIQUE A LA PANDEMIE

1.1. La découverte du Virus de l'Immunodéficience Humaine

Dans les années 80, aux Etats-Unis des patients HSH (Hommes ayant des relations Sexuelles avec des Hommes) ont commencé à présenter une lymphopénie sévère associée à des infections opportunistes. Ces symptômes de déficience immunitaire générale ont alors été caractérisés comme un syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). En 1983, c'est en France à l'Institut Pasteur que le virus responsable du SIDA a été isolé et caractérisé par les Docteurs Françoise Barré-Sinoussi et Jean Claude Chermann dans l'équipe du Docteur Luc Montagnier [1]. L'isolation du virus fut aussi réalisée peu de temps après aux États-Unis par l'équipe du Docteur Robert Gallo. C'est suite au séquençage du génome viral en 1985 que l'agent pathogène responsable du SIDA aura été différencié d'autres rétrovirus déjà connus, c'est ainsi que le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) fut caractérisé.

1.2. La classification du VIH

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) fait partie de la famille des Retroviridae, de la sous-famille Orthoretrovirinae et du genre des Lentivirus. Le genre Lentivirus est un genre particulier de rétrovirus qui se caractérisent principalement par des infections avec de longues périodes de latence, souvent des années à des décennies. Les Lentivirus infectent des hôtes primates et non-primates. Il existe deux espèces de VIH, le *VIH de type 1 (VIH-1)* qui est l'espèce la plus répandue dans le monde et est responsable de la pandémie SIDA et le *VIH de type 2 (VIH-2)* qui est moins pathogénique et présent surtout en Afrique de l'ouest [2].

1.3. Les origines phylogénétiques du VIH-1

Les études phylogénétiques des équipes dirigées notamment par les Docteurs Martine Peeters et Eric Delaporte ont montrées que les Virus de l'Immunodéficience Simienne (SIV) des chimpazés (SIVcpz) et des gorilles (SIVgor) provenant d'Afrique de l'ouest et centrale pourraient être les réservoirs ancestraux du *VIH-1* [3]. Le début de l'épidémie SIDA a été estimé au début des années 1920 en République démocratique du Congo [4]. L'anthropozoonose pourrait s'expliquer par plusieurs expositions indépendantes des singes infectés par un SIV à l'Homme, via des contacts sanguins ou à une exposition à des tissus ou sécrétions infectés, par la consommation de viande de brousse contaminée, des accidents de chasse, ou encore des morsures d'animaux infectés. Le *VIH-1* est un rétrovirus doté d'une forte variabilité génétique du fait de sa réplication rapide, son fort taux de

recombinaisons et de mutations génomiques dues à l'infidélité de sa transcriptase inverse (RT). On recense à l'heure actuelle quatre groupes phylogénétiques représenants différents franchissements de barrière d'espèces. Les groupes M (Majeur), N, O et P [2]. Le groupe M constitue le groupe le plus étendu dans le monde avec 9 sous-types [5]. L'espèce *VIH-2* est organisée en 8 groupes et est surtout présente en Afrique de l'ouest et centrale [6].

1.4. Transmission du VIH-1 et physiopathologie de l'infection

•La transmission du VIH-1 s'effectue par les fluides corporels par voie sanguine, maternelle (accouchement ou lait contaminé) ou sexuelle. La physiopathologie de l'infection par le VIH-1 évolue progressivement en trois grandes phases. **La primo-infection ou phase aigüe**, qui dure entre 3 à 6 semaines, correspond à la période entre la transmission du virus et la phase d'apparition d'une réponse immunitaire spécifique de l'hôte. Le virus se multiplie alors de façon très intensive. Durant cette période le nombre de lymphocytes T $CD4^+$ (LT $CD4^+$) diminue grandement. Les LT $CD4^+$ activés sont permissibles à l'infection par le VIH-1, soit environ 5% de la population de LT $CD4^+$ peut être déplétée du fait d'une réplication virale intense et/ou par mort par apoptose (caspase-3 médié) [7,8]. Cependant, une grande partie (95%) des LT $CD4^+$ demeure non activée et non infectée productivement (les cellules avoisinantes aussi appelées bystanders) et pourrait disparaître des suites d'une infection abortive [9] par pyroptose [10]. L'induction de la mort cellulaire par pyroptose nécessite obligatoirement une transmission entre cellule, un virus libre ne peut induire une telle réponse inflammatoire [11] et représente un modèle de déplétion des cellules dans certains tissus lymphoïdes. Enfin, d'autres LT $CD4^+$ non infectés meurent du fait d'une suractivation du système immunitaire et d'une inflammation chronique [8] et une autre partie par contact avec l'enveloppe virale par apoptose via le mécanisme de l'autophagie [12].

•La deuxième phase est **la phase chronique ou asymptomatique** elle dure quelques années. A la suite de l'établissement de la réponse immunitaire spécifique, l'individu est alors séropositif (séroconversion) et le nombre de LT CD4+ ré-augmente significativement tandis que la charge virale diminue. Commence alors une phase de latence pouvant durer plusieurs années. Elle correspond à un équilibre fragile entre la charge virale, la réponse immunitaire et la quantité de cellule LT $CD4^+$, qui diminue progressivement.

•Enfin, la troisième phase, **le Syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA)** est la conséquence d'une profonde immunodépression de l'hôte, qui dure de quelques mois à quelques années. Le VIH-1 ayant réduit progressivement le nombre de cellules LT $CD4^+$ atteignant un seuil critique (<200 cellules/mm3), la virémie augmente alors de façon exponentielle. L'organisme immunodéprimé est alors particulièrement sensible aux infections opportunistes qui constituent la plus grande menace pour la survie du patient. C'est le stade final de la maladie. A l'heure actuelle, les antirétroviraux n'éliminent pas totalement le virus de l'organisme, mais bloquent sa multiplication et permettent la plupart du

temps une reconstruction normale de l'immunité pour la majorité des patients. La trithérapie engendre néanmoins des effets secondaires importants, fréquents et contraignants chez les patients et constitue un traitement à vie.

1.5. Pandémie et épidémiologie

Plus de trente ans après la découverte du VIH, à ce jour on recense en moyenne 78 millions de personnes infectés [69,5 millions–87,6 millions] par le VIH depuis le début de l'épidémie (OMS/ONUSIDA, novembre 2016). La prévalence en 2015 reste encore très élevée avec 36,7 millions [34.0 millions–39.8 millions] de personnes infectées faisant toujours de ce virus un problème majeur de santé publique. **L'illustration 1A** illustre la répartition mondiale et l'estimation du nombre de personnes vivants avec le VIH en 2015. Au vu de l'avancée de la recherche clinique, sociale, et fondamentale sur l'infection par le VIH, l'ONUSIDA recense un recul de 1,1 million en moins de nouvelles infections en 2015 (2,1 million) comparé aux chiffres de 2000 (3,1 million). De plus l'amélioration des thérapies permet aux personnes infectées de mieux vivre et plus longtemps avec le virus (**illustration 1B**).

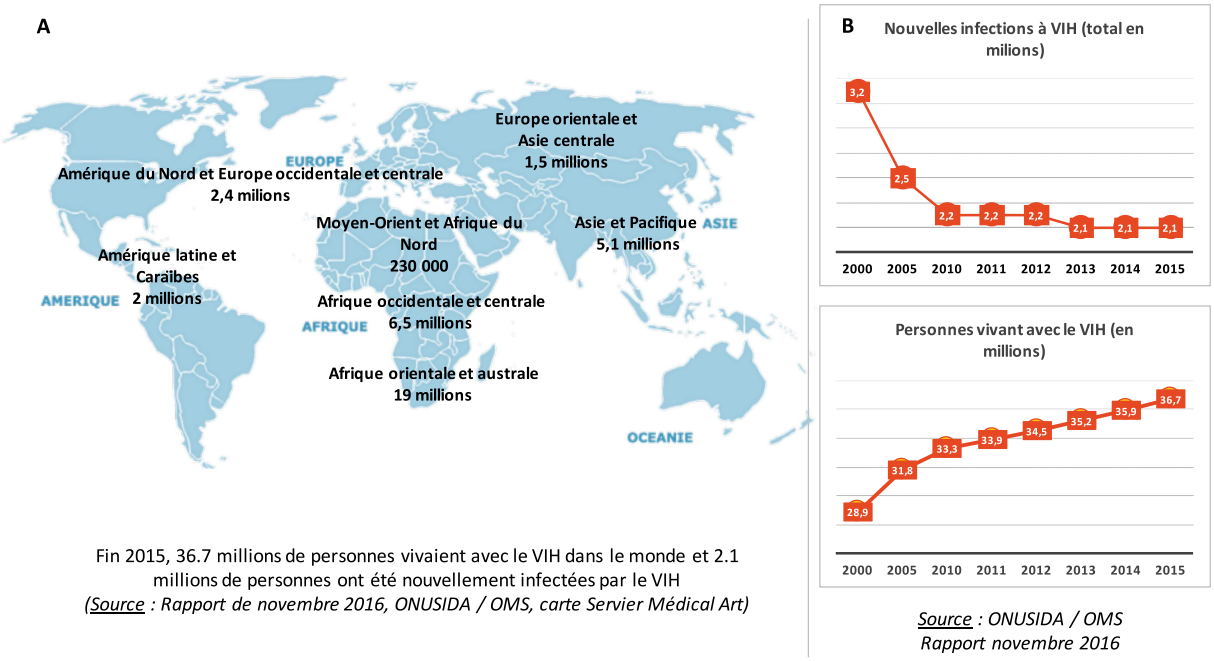
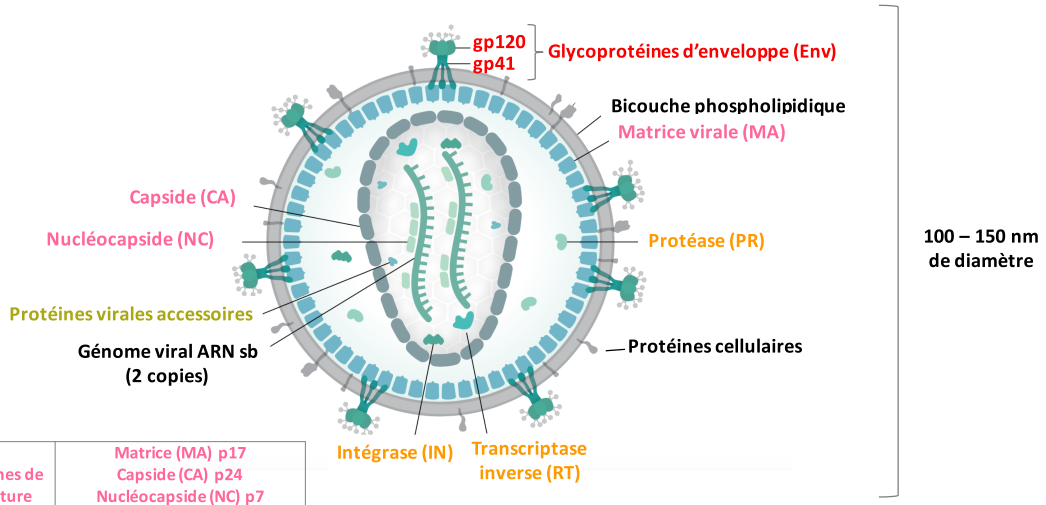


Illustration 1 - Répartition mondiale des populations infectées par le VIH-1

2. STRUCTURE ET ORGANISATION GENOMIQUE DU VIH-1

• Le VIH-1 est un virus enveloppé d'un diamètre de 100 à 150 nm (**illustration 2**). La membrane virale est constituée d'un feuillet de phospholipides provenant de la cellule hôte dans lequel sont enchâssées une vintaine de glycoprotéines d'enveloppe virale (Env) composées de la glycoprotéine d'enveloppe gp120 (surface) et gp41 (transmembranaire) sous forme de trimères. Etant donné que la membrane lipidique du virion provient du bourgeonnement de la cellule hôte, il est aussi possible de constater la présence de récepteurs cellulaires à la surface de la particule. Sous le feuillet lipidique, on retrouve tapissée la protéine p17 formant la matrice virale (MA). L'intérieur du virion est composé d'une capside virale en forme de cage conique comprenant environ 2 000 protéines p24 protégeant deux copies d'ARN génomique viral simple brin de polarité positive [13]. Dans une particule virale mature, le génome viral est associé à des complexes de nucléocapside (NC) protéine p7. Enfin, on retrouve dans un virion trois enzymes virales essentielles pour que le virus puisse effectuer correctement son cycle de réplication et générer de nouveaux virions infectieux. Il s'agit de la transcriptase inverse (RT) responsable de la rétro-transcription du génome viral en ADN double-brin, l'intégrase (IN) qui permet l'intégration de l'ADN double-brin dans le génome de la cellule hôte, une fois intégré dans le génome cellulaire on parle de provirus. Les régions LTR (régions longues répétitions terminales) 5' et 3' créées suite à la transcription inverse du génome viral sont indispensables pour l'intégration de l'ADN proviral dans le génome cellulaire et servent de promoteurs pour la transcription. Enfin la protéase (PR) qui assure le clivage des précurseurs polyprotéiques Pr55 Gag et Pr160 Gag-Pol en protéines virales et la maturation des virions néosynthétisés. Enfin, on ne retrouve que certaines protéines auxiliaires ou dîtes accessoires dans la particule virale.



Gag	Protéines de structure	Matrice (MA) p17 Capside (CA) p24 Nucléocapside (NC) p7 p6
Pol	Protéines enzymatiques	Protéase (PR) p11 Intégrase (IN) p32 Trancriptase inverse (RT) p66
Env	Protéines d'enveloppe	gp120 (SU) gp41 (TM')

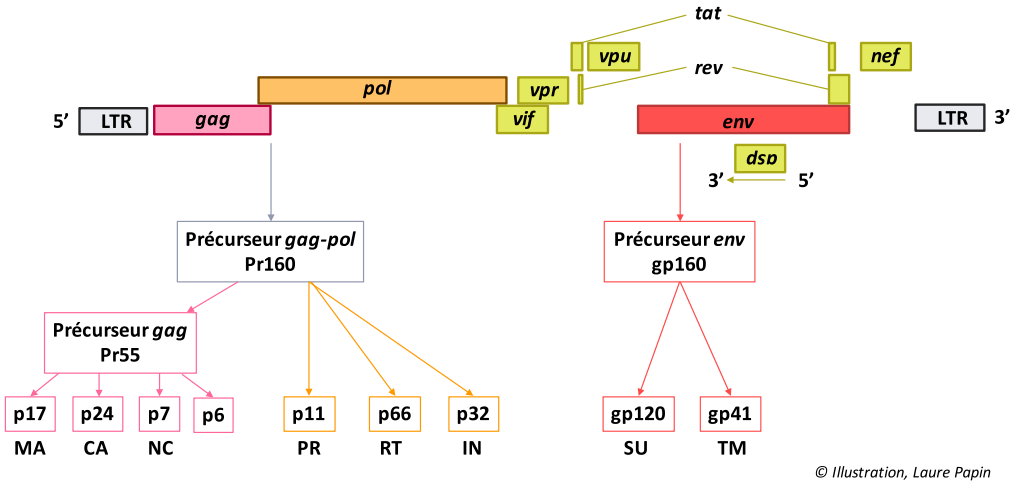
Les protéines de structure sont en rose, enzymatiques en orange et d'enveloppe en rouge.

Illustration 2 - Représentation schématique de la structure de la particule virale du VIH-1

• Chaque brin **d'ARN génomique viral** est constitué de 10 gènes codant pour 16 protéines virales énumérées dans **le tableau 1** qui rassemble les gènes et les protéines virales ainsi que leurs fonctions. On dénombre, trois gènes précurseurs appelés *gag, pol* et *env* (**illustration 3**). Le gène *gag* code pour les protéines structurales de la particule virale telles que les protéines : matrice p17 (MA), capside p24 (CA), nucléocapside p7 (NC) et la protéine p6 retrouvée entre la matrice et la capside ayant un rôle très important lors du bourgeonnement viral. Le gène *pol* code pour les enzymes virales : la transcriptase inverse p66 (RT), l'intégrase p32 (IN) et la protéase p11 (PR). Enfin, le gène *env* code pour deux glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41 formant à elles deux l'enveloppe virale (env). Enfin, le génome du VIH-1 est aussi composé de sept autres petits gènes codant pour les protéines homonymes : *tat, nef, rev, vpu, vpr, vif* et *asp* [14]. Contrairement au *VIH-1*, le *VIH-2* ne possède pas de gènes *asp* [15] et *vpu* mais possède un gène *vpx* retrouvé aussi dans certains SIV.

Gène	Type de protéine	Protéines	Fonction principale
Gag	Protéines de structure	Matrice (MA) p17	Protéine structurale de la matrice, de la capside et de la nucléocapside de la particule virale
		Nucléoprotéine (NC) p7	
		p6	
		Capside (CA) p24	
Pol	Protéines enzymatiques	Protéase (PR) p10	Clive les précurseurs de gag et pol
		Intégrase (IN) p32	Permet l'intégration du double brin d'ADN dans le génome de l'hôte
		Transcriptase inverse (RT) p66	Transcrit l'ARN viral en ADN double brin
Env	Protéines d'enveloppe	gp120 (SU)	Reconnaît le récepteur CD4, CCR5 et CXCR4 permettant l'entrée du VIH par fusion (et d'autres récepteurs cellulaires pour une entrée par endocytose)
		gp41 (TM)	Permet la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique
Asp	Protéines accessoires	Asp (Anti-Sens Protéine)	La fonction d'ASP au cours de l'infection est encore inconnue
Nef		Nef (Facteur de Régulation Négatif)	Régulateur négatif de CD4, DC-SIGN, CMH-I et -II
Rev		Rev (Régulateur de l'expression virale)	Permet l'export de l'ARN viral non épissé du noyau vers le cytoplasme
Tat		Tat (transactivateur)	Régulateur positif de la transcription de l'ADN viral et export nucléaire
Vif		Vif (Infectivité Virale)	Dégrade le facteur de restriction viral APOBEC3G
Vpu		Vpu (Protéine Virale U)	Induit la dégradation intracellulaire de CD4, bloque le facteur de restriction virale BST-2
Vpr (VIH-1)		Vpr (Protéine Virale R)	Régule l'import nucléaire du complexe de pré-intégration (PIC)
Vpx (VIH-2 et SIV)		Vpx (Protéine Virale X)	Dégrade le facteur de restriction viral SAMHD1

Tableau 1 - Les gènes et les protéines du VIH-1 ainsi que leurs principales fonctions



Les protéines de structure sont en rose, les protéines enzymatiques en orange, les protéines d'enveloppe en rouge, les protéines accessoires sont en vert.

Illustration 3 - Représentation schématique du génome du VIH-1

3. LES ETAPES PRECOCES DU CYCLE DE REPLICATION DU VIH-1

3.1. L'entrée virale

Toutes les cellules exprimant le récepteur CD4 à sa surface ainsi que les corécepteurs CXCR4 (C-X-C récepteur à chimiokine de type 4, X4) - et/ou CCR5 (C-C récepteur à chimiokine de type 5, R5) peuvent être considérées comme **susceptibles** à l'infection par le VIH-1, bien que certaines de ces cellules cibles potentielles comme les cellules dendritiques (DC) soient particulièrement réfractaires à l'infection productive [16,17]. Les cellules cibles du VIH-1 sont principalement par les lymphocytes T $CD4^+$, les macrophages et les cellules dendritiques, qui en fonction des sous-types sont plus ou moins permissibles à l'infection. Les souches de VIH-1 sont principalement définies en fonction de leur **tropisme** envers les corécepteurs (CXCR4 ou CCR5) cellulaires utilisés lors de l'entrée virale, ainsi, on peut parler de souche à tropisme R5 ou X4. Le tropisme des souches de VIH-1 est souvent associé à la progression de l'infection virale, en effet, les souches à tropisme R5 sont souvent associées à une infection initiale ou précoce et les souches X4 à une émergence lors des phases tardives de l'infection [18]. Les régions hypervariables d'Env notamment celles exprimées sur la gp120 peuvent notamment expliquer le changement de tropisme R5/X4 au cours de l'infection. Par ailleurs, nous verrons en détails dans le chapitre C.6.2 que le VIH-1 peut aussi **utiliser d'autres récepteurs** pour entrer dans les cellules, notamment les cellules dendritiques. En effet, malgré la nécessité de la présence et de l'utilisation des récepteurs CD4 et corécepteurs pour une infection productive des DC l'entrée du VIH-1 dépend majoritairement de l'endocytose de certains récepteurs [19,20]. Aussi, certains rétrovirus peuvent aussi utiliser le contact direct de cellule à cellule, ce mode de transmission induit la formation d'une **synapse virologique** [11,21]. Ce mode d'entrée sera détaillé dans le chapitre C.6.5.2.

3.2. De l'attachement viral à l'intégration du provirus

•La première étape de l'entrée du virus est **l'attachement** à la cellule cible grâce à la glycoprotéine d'enveloppe virale (Env). Env est composée de deux glycoprotéines : la gp120 et la gp41, issues du clivage (par la protéase virale (PR) p11) du précurseur viral protéique gp160 (**illustration 3**). La gp120 va reconnaitre le récepteur CD4 ce qui va entrainer un changement de conformation (transconformation) de la gp120 [22]. La gp120 interagit alors avec le corécepteur (CXCR4 ou CCR5) favorisant l'exposition de la gp41 à la membrane cellulaire, lui permettant ainsi d'insérer un peptide de fusion induisant la fusion de l'enveloppe virale et la membrane plasmique. Par ailleurs, l'enveloppe virale comporterait une vingtaine de glycoprotéines gp120/gp41 et se regrouperaient en un point focal sous forme de trimères d'interaction avec les récepteurs CD4 [23] (**illustration 4**).

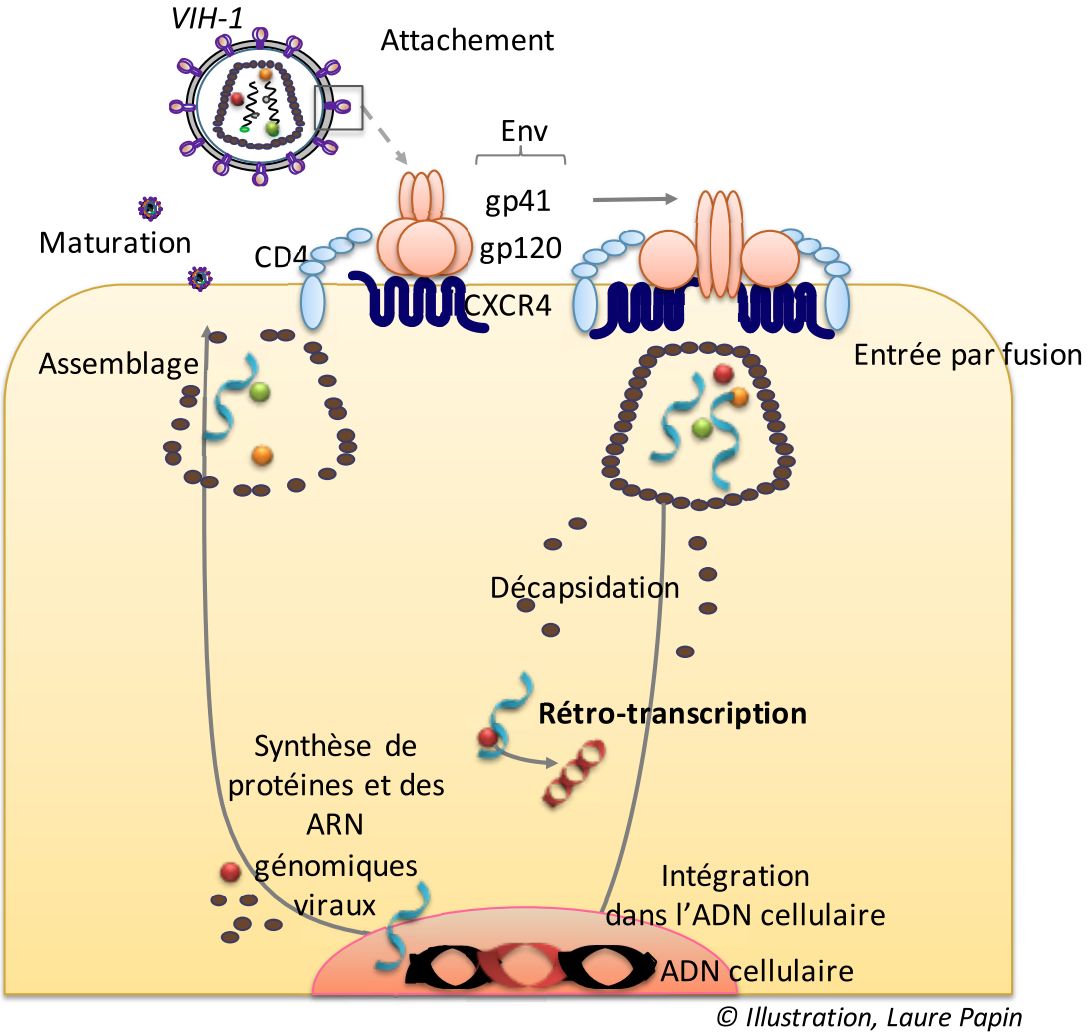


Illustration 4 - Le cycle de multiplication du VIH-1

•La capside contenant le génome viral va alors pouvoir **pénétrer** dans le cytoplasme cellulaire. Les évènements spatio-temporels exacts du relargage du core viral dans la cellule hôte demeurent encore à l'heure actuelle un sujet à controverse [24]. Plusieurs étapes intimement liées vont avoir lieu avant les étapes tardives de l'infection : la décapsidation, la rétro-transcription, l'entrée et l'intégration du génome viral dans le noyau cellulaire. Comme énoncé précédemment, la capside a pour rôle premier de protéger le génome viral de la dégradation, mais celle-ci peut être reconnue par des senseurs cytoplasmiques liés à l'immunité innée générant ainsi une réponse antivirale (chapitre C.7.1.2). Bien que sujet à débats, plusieurs modèles de décapsidation ont été suggérés, l'hypothèse la plus acceptée est que le génome viral commence à être **rétro-transcrit** de l'ARN simple brin en l'ADN double brin grâce à la transcriptase inverse virale (RT) dans la capside virale [24]. La RT est une enzyme peu fidèle, responsable d'erreurs fréquentes (1.10^4 erreurs) durant la réplication ce qui permet au virus d'échapper au système immunitaire de l'hôte et de développer des résistances aux antirétroviraux disponibles [25]. Faisant ainsi émerger de nouvelles souches variantes résistantes mais aussi des virus

perdant leur capacité de réplication. Ainsi, la RT est potentiellement à l'origine de la forte variabilité génétique du VIH-1 et notamment de l'évolution du tropisme viral (mutations d'Env) comme évoqué précédemment. La capside va ensuite être dirigée vers le noyau cellulaire notamment à l'aide du réseau des microtubules cellulaires et c'est une fois arrivée au noyau que survient la **décapsidation.** Une décapsidation trop précoce ou trop tardive pourrait conduire à une perte d'infectivité du VIH-1 [26]. L'ADN viral double brin proviral nouvellement rétro-transcrit, l'intégrase virale, la protéine accessoire Vpr et des protéines CA p24 de la capside virale et cellulaires (notamment la cyclophiline A) forment le complexe de pré-intégration (PIC) [27,28] (**illustration 4**).

•À proximité du noyau le complexe de pré-intégration (**PIC**) va pouvoir traverser les complexes de **pores nucléaires** (NPC) composé d'une trentaine de nucléoporines [29]. Le fait que le VIH-1 utilise les NPC au lieu d'utiliser la mitose comme certains autres rétrovirus confère, à ce virus, la capacité d'infecter des cellules qui ne se divisent pas comme des lymphocytes T CD4 quiescents, des macrophages ou des cellules dendritiques. Bien que l'intégration virale puisse avoir lieu à divers endroits dans le génome de la cellule hôte et que plusieurs facteurs cellulaires et viraux influencent l'intégration, elle semble avoir lieu préférentiellement dans les régions à haute densité de gènes (riche en GC) et à forte activité transcriptionnelle [30]. L'ADN viral va alors être **intégré** de façon irréversible au génome de la cellule hôte, grâce à l'intégrase virale (IN). Toutefois, l'ADN double brin non intégré peut se circulariser et former des molécules circulaires d'ADN viral (appelées cercles 2-LTR) qui contiennent deux régions de promoteur LTR (séquence terminale longue répétée) adjacentes. Ces formes sont reconnues comme étant générées par la machinerie de réparation de l'ADN par jonction des extrémités non-homologues et leur quantification par des méthodes basées sur la PCR est utilisée comme indicateur de l'efficacité de l'import nucléaire [31]. L'intégrase virale multimérise avec les extrémités des régions LTR de l'ADN double brin proviral, exposant les extrémités 3'OH. Une fois le PIC importé dans le noyau l'intégrase se lie à l'ADN cellulaire afin de permettre la recombinaison entre les régions LTR du provirus et l'ADN cible, assistée par les enzymes de réparation cellulaires [32].

3.3. Les étapes tardives de l'infection : l'intégration du génome viral et néo-synthèse virale

La transcription des ARN viraux et la traduction des protéines virales sont assurées par la machinerie enzymatique de la cellule infectée, l'activitation transcriptionnelle virale est donc dépendante de celle de la cellule hôte. La transcription du provirus commence à partir de l'activation du promoteur situé dans les régions LTR par des facteurs cellulaires et viraux après activation du promoteur viral.

•Durant **les étapes précoces de la réplication virale**, les ARN viraux épissés nouvellement synthétisés vont être exportés du noyau cellulaire et les protéines Nef, Rev et Tat vont alors être synthétisées. Tous les Lentivirus expriment une protéine accessoire responsable de la trans-activation de la transcription (**Tat** dans le cas du VIH-1) permettant d'augmenter la transcription des gènes viraux par

recrutement et stabilisation de l'ARN polymérase via le complexe de super elongation. La protéine **Nef** exerce de nombreux rôles importants pour l'infectivité virale et l'installation de l'immunodéficience. Durant la réplication virale la protéine **Nef** va notamment perturber le trafic cellulaire aidant grandement le virus à échapper aux réponses immunitaires. La protéine **Rev** va assurer l'export des ARN viraux non épissés ou partiellement épissés ainsi que des ARN messagers permettant la traduction des protéines impliquées dans la phase tardive de la réplication virale.

•Les protéines exprimées durant la **phase tardive de la réplication** sont les protéines **Vpr, Vif** et **Vpu** dont le rôle est notamment de contrer des facteurs de restriction virale (FRV) ayant pour fonction de limiter la réplication virale. Ces FRV seront détaillés dans le chapitre C.7.1.2 puisque la majeure partie de ces protéines sont actives dans les cellules myéloïdes et en particulier les cellules dendritiques. D'autres protéines virales exprimées dans les phases tardives sont les protéines nécessaires à la structure et à l'assemblage de la particule virale : la polyprotéine précurseur **Pr55 Gag** et **Pr160 Gag-Pol**. Pr55 Gag qui est synthétisée dans le cytosol à partir de l'ARN viral complet est composée des domaines : matrice (MA), capside (CA), nucléocapside (NC) et protéine p6 (**illustration 2 et 3**). La polyprotéine précurseur **Pr160 GagPol** contient les mêmes domaines que la Pr55 Gag avec en plus des domaines correspondant aux enzymes virales protéase (PR), transcriptase inverse (RT) et intégrase (IN). Pr160 Gag-Pol est synthétisée à la suite d'un événement de changement de cadre de lecture programmé lors de la traduction de l'ARN viral codant pour le précurseur Pr55 Gag. La traduction de Pr160 Gag-Pol est plus rare (environ 5% des précurseurs Gag produits) favorisant l'accumulation de protéines structurales requise pour la construction des nouveaux virions contrairement aux enzymes qui sont nécessaires en quantité moindre [33,34].

•Le précurseur Pr55 Gag est la polyprotéine clé articulant les étapes d'**assemblage** et de **bourgeonnement viral**. Pr55 Gag recrute l'ARN génomique viral néosynthétisé, se multimérise et atteint la membrane plasmique par une voie encore non définie [34]. Le **précurseur gp160** de la glycoprotéine d'enveloppe virale Env lui va emprunter le système de sécrétion cellulaire et passer par le réticulum endoplasmique puis par l'appareil de Golgi afin d'être adressé vers la membrane plasmique cellulaire. Les polyprotéines Pr55 Gag accumulées sont ancrées à la membrane plasmique dans des microdomaines radeaux lipidiques et vont aussi permettre le recrutement des glycoprotéines d'enveloppe virale **Env** (gp120/gp41) pour leur incorporation lors de l'assemblage. Le domaine p6 du Pr55 Gag va permettre le recrutement de complexes de tri endosomal requis pour le transport (ESCRT-I –II et -III) permettant à l'aide d'autres complexes cellulaires le bourgeonnement de la particule virale. Une fois que la particule virale a été expulsée de la membrane plasmique par **bourgeonnement**, le clivage protéolytique des précurseurs de polyprotéines Pr55 Gag et Pr160 GagPol effectué par la protéase virale (PR) est indispensable pour la production de particules infectieuses, c'est la **maturation de la particule virale** [33] (**illustration 4**).

3.4. Réservoirs viraux

Depuis plus de 30 ans, les chercheurs du monde entier s'affairent à chercher une solution pour éradiquer le fléau VIH/Sida. Aujourd'hui, le plus grand obstacle à la guérison reste le réservoir viral [35]. En effet, le VIH-1 étant un rétrovirus, le provirus codant pour des virus compétents pour la réplication va pouvoir persister dans le génome de la cellule hôte, c'est ce que l'on appelle la latence. Ces réservoirs viraux contenus dans les cellules cibles du VIH-1 (notamment les LT CD4+ quiescents non activés et mémoires) sont inaccessibles par les traitements antirétroviraux et sont disséminés dans l'organisme (cerveau, tractus gastro-intestinal, organes génitaux, système nerveux central, tissus lymphoïdes ect…) [36]. Ainsi, quand bien même la maitrise de la virémie grâce à la thérapie antivirale, le VIH-1 possède la capacité de ressurgir (réplication résiduelle) et ainsi d'infecter de nouvelles cellules saines. Ceci impose donc aux personnes séropositives de prendre une lourde médication à vie afin de maintenir une charge virale indétectable et ainsi limiter la transmission du virus. La difficulté à éradiquer totalement le virus du VIH-1 chez un patient séropositif repose sur notre manque de capacité à détecter ces cellules réservoirs. Cette année, l'équipe du Docteur Monsef Benkirane a mis en évidence la présence d'un facteur exprimé à la surface des cellules réservoirs [37]. En effet, grâce à l'obtention de LT $CD4^+$ réservoirs, cette équipe a pu décrire l'expression de 103 gènes chez ces cellules dont CD32a qui est exprimé par 80% des cellules réservoirs contenant un virus compétent. La porte s'ouvre ainsi sur l'exploration et l'éradication de ces réservoirs viraux. A présent, il reste à évaluer si les cellules réservoirs non présentes dans la circulation sanguine expriment aussi ce marqueur. L'étude des autres gènes exprimés par les cellules réservoirs permettra probablement d'avancer dans la recherche d'autres marqueurs et d'établir des stratégies thérapeutiques visant à cibler spécifiquement ces niches virales.

CHAPITRE B : LES CELLULES DENDRITIQUES

4. DECOUVERTE ET ORIGINES DES CELLULES DENDRITIQUES

En 1868, Paul Langerhans découvre, dans l'épiderme, des cellules possédant de longs prolongements cytoplasmiques comparables à des dendrites. L'observation de ces cellules dites de Langerhans dans l'épiderme représente la première description de cellules qui s'avèrerent essentielles pour la réponse immunitaire. A la suite à l'amélioration des techniques de purification et de caractérisation des cellules, c'est en 1973 que le Docteur Ralph Steinman identifie et décrit les fonctions des cellules dendritiques [38,39]. Il décrit ensuite leur puissante capacité de stimulation des lymphocytes T, ainsi que leur très efficace capacité de capture et d'apprêtement des antigènes induisant des réponses lymphocytes T effectrices [40]. Les cellules dendritiques (DC) sont alors considérées comme étant les meilleures cellules présentatrices d'antigènes (CPA) de l'organisme en comparaison notamment aux macrophages. Les DC tirent leur nom du fait de leur morphologie particulière en forme d'étoiles présentant des dendrites. Les DC sont des cellules centrales de l'immunité, à l'interface entre le système immunitaire innée et adaptatif. Elles sont capables de reconnaître et de dégrader les antigènes mais aussi d'initier les réponses immunitaires adaptatives [41].

4.1. Ontogénèse des cellules dendritiques

La différenciation des cellules du système immunitaire prend sa source dans la moelle osseuse et est contrôlée par des facteurs de transcription et des cytokines présentes dans un contexte de différentiation cellulaire spécifique. Aussi controversée que discutée, l'ontogénèse des cellules dendritiques fait l'objet de nombreuses publications. J'ai subjectivement choisis d'exposer dans mon manuscrit de thèse les travaux les plus récents concernant l'origine des sous-types de DC (**illustration 5**). Dans la moelle osseuse, certaines cellules souches hématopoïétiques (HSC) vont pouvoir se différencier en des progéniteurs communs myéloïdes (CMP), puis en précurseurs de macrophages et DC (MDP). Ces MDP vont pouvoir ensuite générer soit des progéniteurs communs des cellules dendritiques (CDP) soit des monocytes sanguins. Les monocytes présents dans la circulation sanguine vont pouvoir, suite à des stimuli inflammatoires, rejoindre les organes et tissus non lymphoïdes affectés afin de se différencier en macrophages, en cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDC) ou en cellules de Langerhans dérivées de monocytes (MDLC). D'autre part, les CDP peuvent quant à eux se différencier directement dans le sang en cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) ou en pré-cellules dendritiques (pré-DC). Les pré-DC vont alors pouvoir passer du sang aux organes lymphoïdes secondaires, tissus non lymphoïdes tel que le derme afin de se différencier en fonction du contexte environnemental en cellules dendritiques conventionnelles de type 1 ou 2 (cDC1 ou en cDC2)

ou en cellules de Langerhans (LC) [42–46]. L'**illustration 5** représente l'ontogénèse des cellules dendritiques.

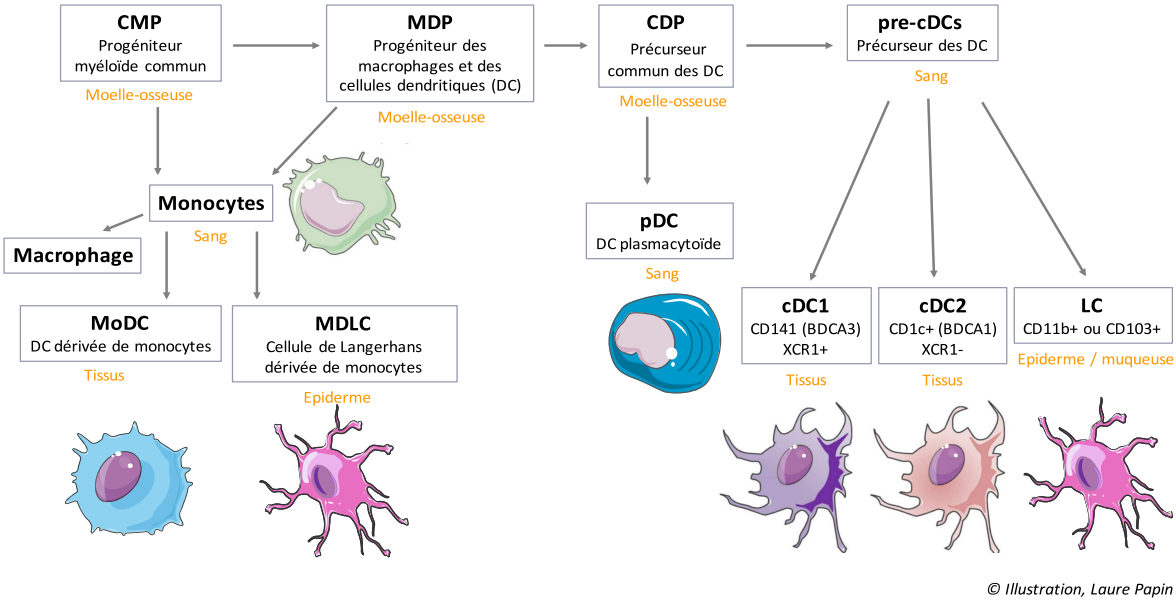


Illustration 5 - Ontogénèse des cellules dendritiques

4.2. Les différents sous-types de cellules dendritiques

Les cellules dendritiques constituent un groupe de cellules hétérogènes. En effet, les DC sont réparties dans tout l'organisme notamment au niveau de sites propices à la rencontre de pathogènes comme la peau, le sang et les muqueuses ou encore dans les espaces interstitiels ou dans des organes lymphoïdes secondaires. Ce sont des cellules dites sentinelles capables de s'adapter et d'adapter leur réponse en fonction de l'environnement et du type d'antigène détecté. C'est pourquoi il existe plusieurs sous types de DC spécialisées, exprimant des récepteurs variés à leurs surfaces en fonction de leur état de maturation, de leur environnement et de leur localisation dans le corps. La plupart des études de caractérisation des sous-populations de DC ont été réalisées chez la souris où l'on recense plus de 9 sous-types de DC. Dans le but de classifier les DC, de nombreuses études ont été réalisées en utilisant diverses caractéristiques: une classification phénotypique tissulaire pour chaque espèce (expression de récepteurs de surface) [43], protéomique et fonctionnelle (facteurs de croissances, expression de cytokines) [45], ou encore une classification basée sur l'ontogénie des cellules myéloïdes [47]. Récemment, les groupes des docteurs Marc Dalod et Florent Ginhoux ont comparé les sous-types murins et humains ainsi que les sous-types humains entre eux de façon à proposer une classification universelle des sous-populations de DC [43,48,49]. Une classification des DC humaines en 5 sous-populations a alors été suggérée : les cellules dendritiques conventionnelles de type 1 (cDC1), de type 2 (cDC2), les cellules dendritiques issues de monocytes (MoDC), les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), et enfin les cellules de Langerhans (LC) dérivées de monocytes ou provenant du

même précurseur que les cDC [46,48]. Le **tableau 2** résume certaines caractéristiques de ces sous-types de DC.

Sous-type de DC		Localisation principale	Particularité / fonction	Marqueurs de surface discriminants caractéristique immature
cDC : cellules dendritiques conventionnelles	**cDC**1	Derme, sang, organes lymphoïdes	•Haute efficacité d'activation des LT CD8+ (en particulier via la cross-présentation)	CD141 high (BDCA3) XCR1+ (favorise interaction DC-LTCD8+) principalement TLR3 CLEC9a (cross présentation) VIH recept+
	cDC2	Derme, sang, organes lymphoïdes	•Haute efficacité d'activation des LT CD4+	CD1c+ (BDCA1) XCR1- CD11c+ TLR sauf TLR9 VIH recept+
MoDC : cellules dendritiques issues de monocytes		Sang puis derme puis organes lymphoïdes	•Différenciation à partir de monocytes sur le lieu de l'inflammation •Fort pouvoir de dégradation et de présentation antigénique	CD209 (DC-SIGN) high CD207 low CD1c low CD14 low VIH recept+
LC : cellules de Langherans		Epiderme	•Hautement migratoire •Expriment des granules de Birbeck sous le contrôle de CD207 •E-cadherine est un récepteur d'adhésion •CD1a permet la présentation d'antigènes lipidiques aux LT	CD207 (langerine) high CD1a (présente lipide) E-cadherine CD45 CD11c+ CD209 low VIH recept+
pDC : cellules dendritiques plasmacytoïdes		Présentes dans le sang et absente dans les tissus périphériques à l'état basal	•Différenciation dans la MO •Immatures elles sont rondes •Expriment de grande quantité d'interféron de type I (contexte viral), •Faible capacité de phagocyte,	CD123(IL3R), CD303(BCDA2), CD11c- CD14- BDCA4 CD304, CD14- TRL endosomaux 7/9, CMH II+ et MCS VIH recept+

DC : cellule dendritique, MCS : marqueurs de co-stimulation CD80 CD86 CD40, VIH recept : CD4+, CCR5+, CXCR4+, BDCA : Blood Dendritic Cell Antigen

Tableau 2 - Caractéristiques discriminantes des sous-types de DC

4.2.1. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) qui représentent environ 0,5% des PBMC (cellules mononuclées du sang périphérique), sont des DC qui se différencient le plus des cDC selon plusieurs caractéristiques [50,51]. Au niveau phénotypique, elles sont rondes et se trouvent majoritairement dans le sang, les organes lymphoïdes et les tissus périphériques en absence de stimuli. Dans ce contexte basal, les pDC expriment de faibles niveaux de CMH-II, de molécules de co-stimulation et possèdent une faible capacité de phagocytose. Les pDC ont aussi la particularité d'exprimer les Toll-Like Récepteur (TLR)-7 et 9 intracellulaires [52]. L'isolation *in vitro* de pDC à partir de PBMC est notamment permise grâce à l'expression spécifique de récepteurs lectine de type C tels que Blood Dendritic Cell Antigen (BDCA)-2 et 4 [51]. Bien que l'ontogénèse de ces cellules fut longtemps débattue par la communauté scientifique, il semble quelle soient issues du même précurseur que les autres sous-types de DC (**illustration 5**) [42,43,50]. Enfin, les pDC sont notamment reconnues pour leur capacité de production de grandes quantité d'interféron de type I en réponse à une stimulation virale [53].

4.2.2. Les cellules dendritiques conventionnelles (cDC)

Les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) coexistent sous forme de deux groupes distincts (cDC1 et cDC2) notamment dans les organes lymphoïdes tels que la rate, les ganglions lymphatiques, ou le thymus. Ces cDC résidentes vont contribuer, avec les macrophages, à la surveillance et au maintien de l'intégrité des tissus. Autrefois connues sous les termes de cellules dendritiques interstitielles ou myéloïdes, leur identification et leur classification ont été définies selon l'expression de marqueurs de surface [43] ainsi que l'étude des facteurs de transcription (TFs) requis pour leur développement et/ou leur fonction [45]. Les DC conventionnelles ou myéloïdes ont été subdivisées en deux sous-groupes sur la base de leur expression de CD141 (également appelé BDCA3) et CD1c (également appelé BDCA1). En conséquence, une classification universelle récente a suggéré de considérer les DC CD141$^+$ comme étant les cDC1 et les DC CD1c$^+$ comme étant les cDC2. Au niveau fonctionnel, les cDC1 possèdent une haute efficacité d'activation des LT CD8$^+$ (en particulier via la présentation croisée) alors que les cDC2 sont capables d'une haute efficacité d'activation des LT CD4$^+$ [43,54] (**tableau 2**).

4.2.3. Les cellules de Langerhans (LC)

Les cellules de Langerhans (LC) sont des DC résidentes de l'épiderme de la peau ainsi que des couches mucosales supra-basales [41,46]. Les LC possèdent des dendrites particulièrement étendues et forment un réseau dans l'épiderme et représentent la première barrière immunologique contre l'environnement extérieur [55]. Les LC ont la particularité d'exprimer le récepteur E-cadherine, le récepteur lectine de type C CD207 (langerine), et présentent des structures trilamellaires intracytoplasmiques appelées Granules de Birbeck. Le récepteur E-cadherine est un récepteur d'adhésion, il permet notamment aux LC de rester stablement accrochées aux kératinocytes dans l'épiderme [56]. Au vu de leur localisation stratégique, les LC possèdent une forte capacité migratoire leur permettant de présenter les antigènes issus de la capture des pathogènes dans les organes lymphoïdes. Ainsi, lors de la migration des LC, l'expression du récepteur E-cadherine est diminuée pour permettre aux LC de rejoindre les organes lymphoïdes secondaires. Le récepteur CD207 a été identifié à la surface des LC humaines en 2000 et c'est dans ce même article qu'il a été décrit que la présence de ce récepteur permet la formation des GB [57]. De plus, l'engagement de CD207 à la surface cellulaire des LC humaines par un anticorps monoclonal spécifique induit l'internalisation et le trafic du récepteur vers les granules de Birbeck [57].

4.2.4. Les cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDC)

Les cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDC) sont issues directement de monocytes qui ont migré par chimiotactisme de la circulation sanguine vers le site de l'inflammation tel que les tissus périphériques. S'opère alors la différenciation des monocytes en MoDC. Probablement dû à leur infiltration sur les sites d'inflammation, les MoDC expriment un large éventail de récepteurs à leur surface de façon à pouvoir être capables de capturer les pathogènes responsables de l'inflammation [58]. La plupart des études visant à mieux caractériser ce sous-type de DC a principalement été effectué dans des MoDC différenciées *in vitro*, à partir de monocytes isolés du sang périphérique (voir le sous-chapitre suivant). Enfin, dans un contexte plus physiologique, la différenciation des monocytes en MoDC peut s'initier dans les tissus endothéliaux mais que la différenciation complète nécessite des stimuli supplémentaires tels que l'absorption de particules ou l'exposition à des micro-organismes [59,60].

4.2.5. Modèles de cellules dendritiques

Concernant l'étude des cellules dendritiques humaines *in vitro*, deux modèles de cellules ont particulièrement été utilisés : les DC obtenues à partir de précurseurs circulants $CD34^+$ ou à partir de monocytes sanguins $CD14^+$ [61]. Le modèle de DC issu de précurseurs $CD34^+$ sanguins d'adulte ou de sang de cordon, a été étudié pour la première fois en 1994, par l'addition de « Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor » (GM-CSF) et de « Tumor Necrosis Factor » (TNF) ou d'Interleukine (IL)-4 [62]. Comme que les précurseurs circulants $CD34^+$ représentent moins de 0,2% des leucocytes, dans la plupart des études *in vitro* les chercheurs utilisent des MDDC obtenues à partir de monocytes $CD14^+$ sanguins qui représentent environ 10% des cellules mononucléées du sang humain [61]. Les MDDC ont été obtenues pour la première fois en 1994 par l'addition de GM-CSF et d'IL-4 [62,63]. Les MDDC, différenciées en 3-5 jours, s'avèrent être un bon modèle d'étude pour les DC générées dans un contexte inflammatoire afin d'étudier les capacités des MoDC à exploiter leur potentiel microbicide, leur capacité à stimuler les réponses des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ ainsi que leur capacité à réguler la production d'immunoglobulines par les lymphocytes B [58].

5. LES CELLULES DENDRITIQUES, LES SENTINELLES DE L'IMMUNITE ANTI-INFECTIEUSE

5.1. Les cellules dendritiques sont les piliers du maintien de l'homéostasie immunitaire

La famille des cellules dendritiques possède un rôle crucial, ajusté, central et indispensable à l'homéostasie du système immunitaire. Comme détaillé précédemment, les DC représentent un ensemble de sous-type de cellules hétérogènes très spécialisées et aux fonctions multiples. En effet,

en tant que composant majeur de l'immunité innée, les DC sont capables de coopérer avec les autres cellules dans une démarche de tolérance du soi ou des différentes flore microbiennes, telle que la flore commensale. En revanche, dans un contexte d'infection virale, afin de maintenir l'intégrité biologique de l'organisme, les DC font partie des cellules les mieux armées pour détecter les pathogènes et initier une réponse immune adaptée. Les DC possèdent un large éventail de récepteurs leur conférant une grande capacité de reconnaissance des stimuli environnants ainsi que la capacité d'adapter et d'optimiser leur activation. Les DC vont donc reconnaître le non soi, le capturer, s'activer, dégrader les pathogènes, devenir matures et migrer afin de présenter les antigènes issus de la dégradation des pathogènes aux lymphocytes T pour initier une réponse immune adaptée.

5.2. Le rôle premier des cellules dendritiques : la reconnaissance des signaux de danger

Certaines cellules du système immunitaire expriment des effecteurs spécifiques solubles et/ou cellulaires de reconnaissance de signaux du non-soi ou de danger. Les DC font partie des cellules immunitaires possédant le plus large éventail de récepteurs cellulaires reconnaissant des motifs issus de pathogènes (« Pathogen Recognition Receptor » ou PRR). Ces PRR sont des récepteurs cellulaires exprimés en majeure partie par des cellules myéloïdes telles que les monocytes, les macrophages et les différents sous types de DC [64]. Des cellules potentiellement exposées à des signaux de dangers, comme certaines cellules épithéliales des muqueuses notamment peuvent également en exprimer. Les PRR reconnaissent des motifs particuliers très conservés exprimés par divers organismes étrangers appelés motifs moléculaires associés aux pathogènes PAMP (« Pathogen Associated Molecular Pattern »). Ces récepteurs spécialisés dans la détection du danger peuvent aussi reconnaître certaines macro-molécules cellulaires générées ou altérées suite à la rencontre d'un agent étranger, les DAMP (« damage-associated molecular patterns »). Dans le contexte d'une infection virale, les PAMP pouvants être reconnus sont principalement les glycoprotéines de surface (d'enveloppe ou de la capside si virus nu), les protéines de capside ainsi que le génome viral. Les interactions entre les différents PRR exprimés par les DC avec le VIH-1 seront traitées dans le chapitre C.7.1.1.

5.2.1. Les récepteurs Toll-like (TLR)

Les TLR sont des récepteurs transmembranaires ayant tous une structure commune comprenant un domaine extracellulaire riche en leucine (LRR) permettant la reconnaissance des PAMP et un domaine cytoplasmique TLR/IL-1R (TIR) important pour la transduction du signal [65]. Lorsqu'un ligand est reconnu par le TLR adéquat, selon le TLR deux protéines peuvent être recrutées : MyD88 (« Myeloid differentiation primary response gene 88 ») et/ou TRIF (« TIR-domain-containing adapter-inducing interferon »). Ce recrutement induit une cascade d'activation de protéines kinases, telles que les membres de la famille des kinases activées par des mitogènes (MAPK), aboutissant à l'activation de

facteurs de transcription majeurs tels que NF-κB ou des facteurs de régulation de l'interféron (IRF). Ces voies représentatives de la réponse immune innée conduisent à l'induction de réponses anti-infectieuses avec notamment la production d'interféron (IFN) de type I, de cytokines pro-inflammatoires, l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation et, plus généralement, à la maturation des DC [66]. Les TLR-1, 2, 5 et 6 sont exprimés sur la membrane plasmique alors que les TLR-3, 7 et 8 sont très fortement exprimés à la surface de compartiments endosomaux et les TRL-4 et 9 peuvent être retrouvés exprimés en surface et en intracellulaire [67]. Les TLR-7 et 9 reconnaissent notamment des acides nucléiques exogènes, respectivement l'ARN simple brin et l'ADN CpG non méthylé [68,69].

5.2.2. Les NOD-like récepteurs (NLR)

En plus des TLR, les DC expriment des PRR cytosoliques dont le rôle consiste à percevoir les signaux de dangers intracellulaires. Les NOD-like récepteurs (NLR) constituent la famille la plus vaste de ces récepteurs intra-cytoplasmique. Comme les TLR, ils sont constitués d'un domaine LRR leur permettant de détecter les PAMP. Ensuite ils sont constitués d'un domaine NOD (« Nucleotide-binding Oligomerization Domain ») qui permet une oligomérisation, puis d'un domaine effecteur pouvant être CARD (« Caspase Recruitment Domain »), PYD (« PYrin Domain ») ou BIR (« Baculovirus Inhibitor Repeat ») impliqué dans la régulation de l'apoptose ou de processus inflammatoires. Les NLR reconnaissent principalement des PAMPs bactériens tel que l'ARN bactérien, le LPS (lipopolysaccharide caractéristiques des bactéries Gram négatives) ou encore les toxines intracellulaires [70]. La détection par les NLR de composants bactériens va généralement induire l'activation des DC qui initieront une réponse immunitaire adaptée. À ce propos, l'activation des DC avec des agonistes de NOD1, NOD2 et des ligands de TLR-7 et 8 aboutit à une libération synergique de médiateurs pro-inflammatoires qui favorisent l'activation des cellules T productrices d'IL-17 [71]. NOD2, est exprimé par un nombre limité de tissus comme les cellules épithéliales intestinales, les cellules de Paneth et les cellules dérivées de monocytes comme les DC. Il a d'ailleurs été montré que l'activation de NOD2 par son ligand bactérien, est capable d'induire la voie autophagique dans les MDDC [72]. L'implication des PRR dans l'activation ou l'inhibition de l'autophagie sera notamment décrite dans le chapitre D.11.1.

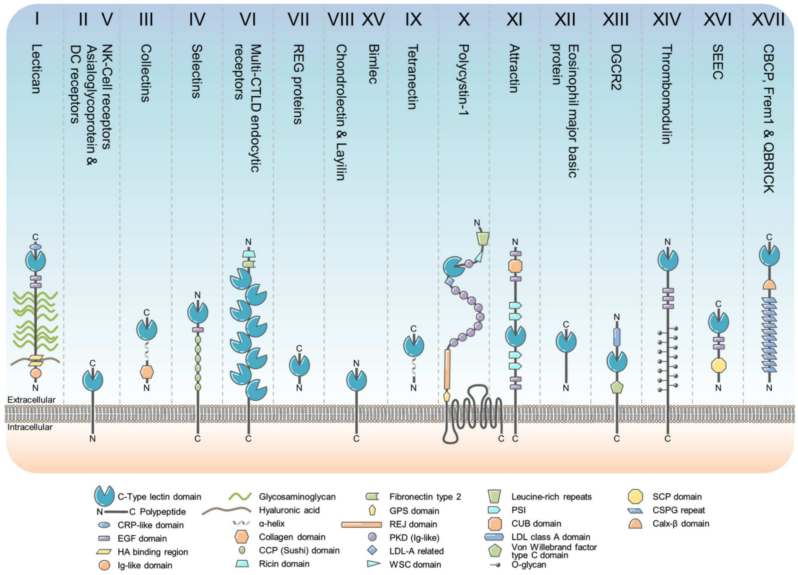
5.2.3. Les RIG-I like recepteurs (RLR)

Tout comme les NLR, les RIG-I like récepteur (RLR) représentent une famille de récepteurs cytoplasmiques capables de détecter des constituants du non-soi. Les RLR reconnaissent les acides nucléiques viraux. Les RLR sont exprimés par la plupart des cellules humaines, comme les DC et sont particulièrement importants pour la reconnaissance des virus [73]. Tous les RLR sont présents à des

niveaux faibles dans les cellules, mais leur expression est fortement induite par l'IFN de type I [74]. Les RLR appartiennent à la famille des hélicases à boîte DExD (séquence aspartate-glutamate-x-aspartate) et sont constitués, comme certains NLR, d'un ou deux domaines CARD, un domaine hélicase et un domaine de reconnaissance des PAMP. Les RLR MDA-5 (« melanoma-differentiation-associated gene « 5) et LGP2 (« laboratory of genetics and physiology 2 ») reconnaissent uniquement les ARN double brin (ARN db) notamment au-delà d'une certaine longueur de séquence. En revanche, RIG-I (retinoic-acid-inducible protein 1) peut reconnaître l'ARN db mais aussi et l'ARN simple brin (ARN sb) quand ceux-ci sont marqués d'un groupement triphosphate en 5'. Concernant la signalisation de RIG-I, il a été décrit qu'une E3 ligase, TRIM25 (protéine de motif tripartite TRIM) est requise pour la transduction du signal cytosolique induisant une réponse IFN lors de l'infection virale [75].

5.2.4. Les récepteurs lectine

La super-famille des lectines est une famille de protéines reconnaissant les motifs carbohydrates (oligo/poly-saccharidiques et glyco-lipides/protéines) provenant de structures : soit présentes à la surface de cellules, soit cytoplasmiques ou extracellulaire et produites par l'organisme lui-même, ou bien par des organismes étrangers durant une infection. Les lectines agissent en médiateurs cellulaires et sont présentes notamment chez les plantes, les animaux et les micro-organismes [76]. Il est intéressant de noter que certaines des voies de signalisation générées par ces différentes familles de lectines convergent vers des résultats fonctionnels similaires indépendamment des divergences dans leur structure, leur homologie ou leurs spécificités de liaison au carbohydrate [77]. La classification actuelle des lectines propose 15 familles de lectines dont les galectines, les Siglec et les C-type lectine récepteur (CLR) [78]. **L'illustration 6** représente les différents types de lectine.



Source : Mayer S. et al., *Histochem Cell Biol*, 2017, C-type lectins: their network and roles in immunity/pathogen recognition. Tous droits réservés aux auteurs.

Illustration 6 - Représentation schématique des différents types de lectine

5.2.4.1. Les galectines

Les galectines (lectine de type S) représentent une famille de lectines solubles sécrétées permettant d'assurer la surveillance de l'intégrité de certaines vésicules cytoplasmiques. En effet, la dégradation d'une membrane vésiculaire engendrée, par exemple, par l'entrée de bactéries peut être détectée par les galectines, qui se lient aux motifs glycans (ß-galactoside) générés par les vésicules endommagées. Les galectines vont alors pouvoir servir de signaux de danger afin de recruter des protéines dites « récepteurs autophagiques » afin d'initier une autophagie antibactérienne [79,80]. Le rôle de certaines galectines dans l'autophagie selective sera traité plus en détails dans le chapitre D.10.3 ci-après.

5.2.4.2. Les siglec

Les lectines de type I, siglec (sialic acid binding Ig-like lectins) peuvent reconnaître des glycoprotéines et des glycolipides contenant de l'acide sialique provenant d'agents pathogènes, contribuant ainsi aux réponses immunes innées de l'hôte mais jouent aussi un rôle important dans la reconnaissance du soi [81]. Suivant des états plus ou moins activés, la plupart des sous-types de DC expriment différents récepteurs siglec à leurs surface sauf les pDC qui semblent n'exprimer que siglec-5 [81,82]. Certains récepteurs siglec peuvent jouer un rôle dans la transmission du VIH-1 des DC matures vers les LT $CD4^+$ [83].

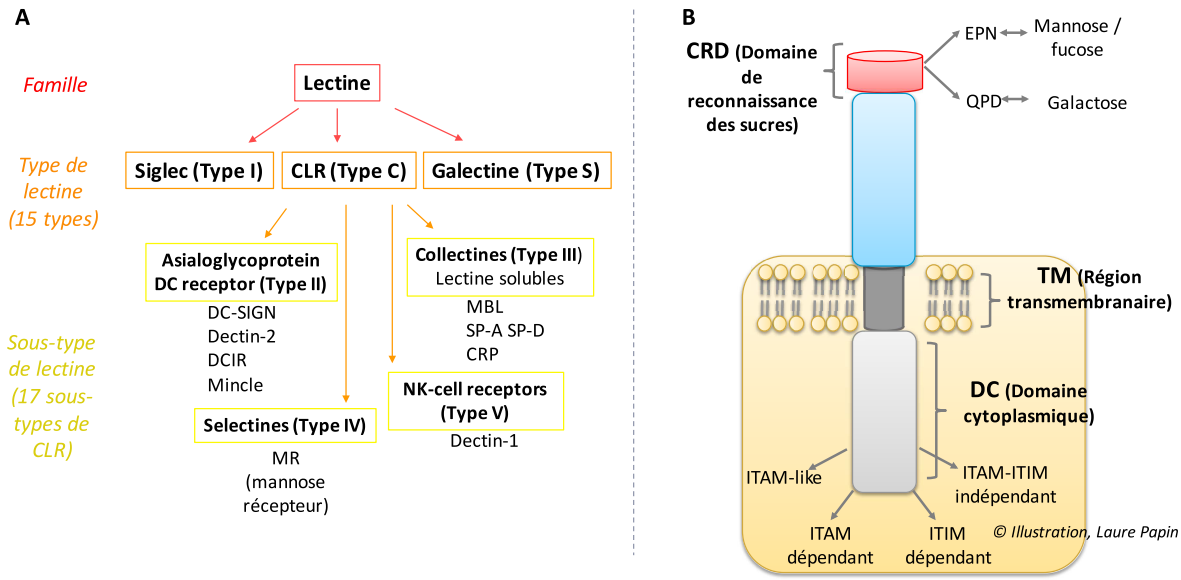
5.2.4.3. Les lectines solubles

La famille des lectines est très hétérogène, il existe des CLR transmembranaires exprimés à la surface cellulaire (décrit ci-après) mais il existe aussi des lectines solubles sécrétées (type III les collectines) par les cellules hépatiques ou pulmonaires permettant la reconnaissance de motifs polysaccharidiques microbiens. Les lectines solubles les plus caractérisées sont la MBL ou MBP (« mannan-binding lectin /protein »), les protéines SP-A et –D du surfactant pulmonaire, ou encore la CRP (« C-Reactive protein »). En effet, à titre d'exemple, on peut citer la protéine CRP couramment utilisée en médecine comme témoin sanguin d'une inflammation en cours [84]. Ces lectines solubles vont notamment permettre l'activation du complétement permettant le chimiotactisme des cellules phagocytaires, la lyse des micro-organismes reconnus via les phagocytes (opsonisation) et l'activation du complément générant un contexte inflammatoire au vu de l'élimination de la menace infectieuse [85].

5.2.4.4. Les récepteurs de la famille des lectines de type C (CLR)

Les CLR, sont impliqués dans la perception de motifs carbohydrates (mannose, fucose, galactose) notamment ceux exprimés par les micro-organismes. Les lectines de type C constituent la plus grande et la plus diverse des familles de lectines retrouvées caractérisées chez les animaux. Les lectines de type C contiennent un domaine de reconnaissance des carbohydrates (CRD), qui, dans la plupart des

cas, lie les glucides par ligation calcium dépendante (Ca2+). Cependant, parmi les CLR il existe un groupe qui ne possèdent plus le site de liaison calcium dépendant dans leur domaine CRD, on parle alors de lectine de type C domaine-like (C-type lectin-like domain CTLD). Les CLR représentent un groupe vaste et varié de récepteurs, grandement représentés à la surface des cellules myéloïdes et notamment des DC, bien que d'autres cellules en expriment faiblement comme certaines cellules sanguines (granulocytes et les lymphocytes NK), ou encore certains épithéliums. On recense des différences importantes dans l'expression des CLR selon le sous-type de DC, en fonction de leur état d'activation et de leur localisation tissulaire [85]. En effet, certains sous-types de DC expriment de façon caractéristique certain CLR, par exemple, les pDC expriment BDCA2 [51] et les LC la langerine (CD207) [57]. A l'heure actuelle, sur la base des critères phylogénétiques et la structures des domaines CRD des CLR on dénombre 17 types de CLR (I-XVII) [86–88].



A)Représentation schématique de la classification des principaux types de récepteurs lectine impliqués dans la reconnaissance des pathogènes. B) Représentation schématique de la structure d'un récepteur lectine de type C (CLR).

Illustration 7 - Représentation schématique de la classification des lectines et d'un récepteur de lectine de type C

5.3. Les récepteurs lectine de type C membranaires

5.3.1. Structure

Concernant leur structure les récepteurs lectine de type C membranaires sont tous composés d'au moins un domaine de reconnaissance des sucres (CRD). Concernant le CRD, les motifs hautement conservés Glu–Pro–Asn (EPN) et Gln–Pro–Asp (QPD) sont essentiels pour la reconnaissance des ligands composés de mannose, glucose et fucose ou de galactose respectivement [89,90]. Cependant, cela n'est pas exclusif, deux CLR (langerine et DCIR-2) possédant un motif EPN peuvent reconnaître certains motifs galactoses [86]. Etant des récepteurs membranaires, ils possèdent tous une partie

transmembranaire et un domaine intra-cytoplasmique. On peut aussi distinguer les différents types de CLR selon leur séquence protéique. Les CLR du type IV (mannose récepteur, MR) ont leur extrémité N-terminale extracellulaire alors que les CLR de type II (DC-SIGN, langerine, Dectin-2) et V (Dectin-1) ont leur extrémité N-terminale intra-cytoplasmique. En plus d'agir comme des senseurs de manière similaire aux autres familles de PRR précédemment décrits (TLR, NLR, NLR), la plupart des CLR sont aussi impliqués dans l'adhésion et la migration des DC. De plus, certain CLR de type II, IV et V sont impliqués dans la reconnaissance, la capture et la dégradation de pathogènes induisant une signalisation et l'initiation de réponses immunes adaptées en contribuant, par exemple, à la présentation antigénique [91,92]. **L'illustration 7** comporte une représentation schématique de la classification des principaux types de récepteurs lectine impliqués dans la reconnaissance des pathogènes ainsi qu'une représentation schématique de la structure d'un CLR. Le **tableau 3** rassemble les principales lectines impliqués dans la reconnaissance des pathogènes, leur localisation ainsi que leur structure.

CLR name	Gene	CLR type	Expressing cells	Signaling motif (CRD)	Ligand	Pathogen binding	Fonction
DC-SIGN	CD209	II	MoDC / cDC	ITAM-ITIM independant	High-mannose and fucose glycans, Lewis antigens Mannose,	Mycobacterium spp., H. pylori, Lactobacillus spp., Leishmania spp., VIH-1, Dengue virus, Measles virus, Influenza A virus, Zika virus	Pathogen recognition; Antigen uptake; APR/T cell interaction; cell migration
Langerin	CD207		LC		mannose / fucose / ClcNAc, ß1,3 glucans	VIH-1 / VIH-2 / SIV	Pathogen recognition; Antigen uptake; APR/T cell interaction
Dectin-2	CLEC6A		mono / macro / DC / LC	ITAM-coupled	High-mannose glycans, α-mannans, O-linked mannobiose-rich glycoprotein α-Mannose,	M. tuberculosis, S. enterica, S. mansoni, C. albicans, A. fumigatus, Malassezia spp.	Pathogen recognition; antigen uptake
Dectin-1	CLEC7A	IV	mono / macro / DC / LC	ITAM-like	ß1,3 glucans	Mycobacterium spp., L. infantum, C. albicans, P. carinii, A. fumigatus, C. neoformans	Pathogen recognition; T cell differentiation
Mannose receptor (MR)	MRC1	V	macro / mono / DC /LC	ITAM-ITIM independant	mannose / fucose / sialyl-Lex	S. pneumoniae, K. pneumoniae, C. albicans, P. carinii, VIH-1, Dengue virus	Pathogen recognition; Antigen uptake; Cell adhesion; phagocytosis
DEC-205	CD205	I	LC / DC / mono / pDC / LB / LT		CpG oligonucleotides	/	capture and antigen uptake, APR
BDCA-2	CD303	II	pDC	ITAM-coupled	Asialogalactosyl oligosaccharide	/	Inhibit interferon alpha/beta production
DCIR	CLEC4A	II	mono / macro / LB / DC / neutrophile / pDC	ITIM coupled	mannose / fucose	VIH-1	Inhibition of APC functions such as cytokine production

Tableau 3 - Principales lectines impliquées dans la reconnaissance des pathogènes, leur localisation ainsi que leur structure

5.3.2. Signalisation

La reconnaissance de micro-organismes exprimant des motifs carbohydrates à leur surface par certains CLR va permettre l'initiation de signalisations cellulaires anti-infectieuses. Il est possible de classer les CLR en 4 groupes en fonction de motifs d'acides aminés conservés exprimés dans leur domaine

cytoplasmique (**illustration 8**). En effet, la signalisation induite dépend, d'une part de la séquence de ces motifs et des complexes protéiques associés au récepteur et, d'autre part de la nature des carbohydrates reconnus par le récepteur. Les 4 groupes sont les suivants : les récepteurs exprimant un motif **ITAM** (Motif d'Activation des récepteurs Immuns basé sur la Tyrosine) c'est à dire la séquence « Yxx(L/I) » répété deux fois, ceux exprimant un motif **ITAM-like** c'est à dire ce même motif exprimé une seule fois, ceux exprimant un motif **ITIM** (Motif d'Inhibition des récepteurs Immuns basé sur la Tyrosine) « I/V/LxxYxI/V/L » et enfin les CLR n'exprimant **aucun** de ces trois motifs. De nombreux articles de revue montrent que la signalisation subséquente peut varier selon le modèle et l'espèce cellulaire utilisés lors de l'étude ou encore en fonction du ligand reconnu par le CLR [89,93].

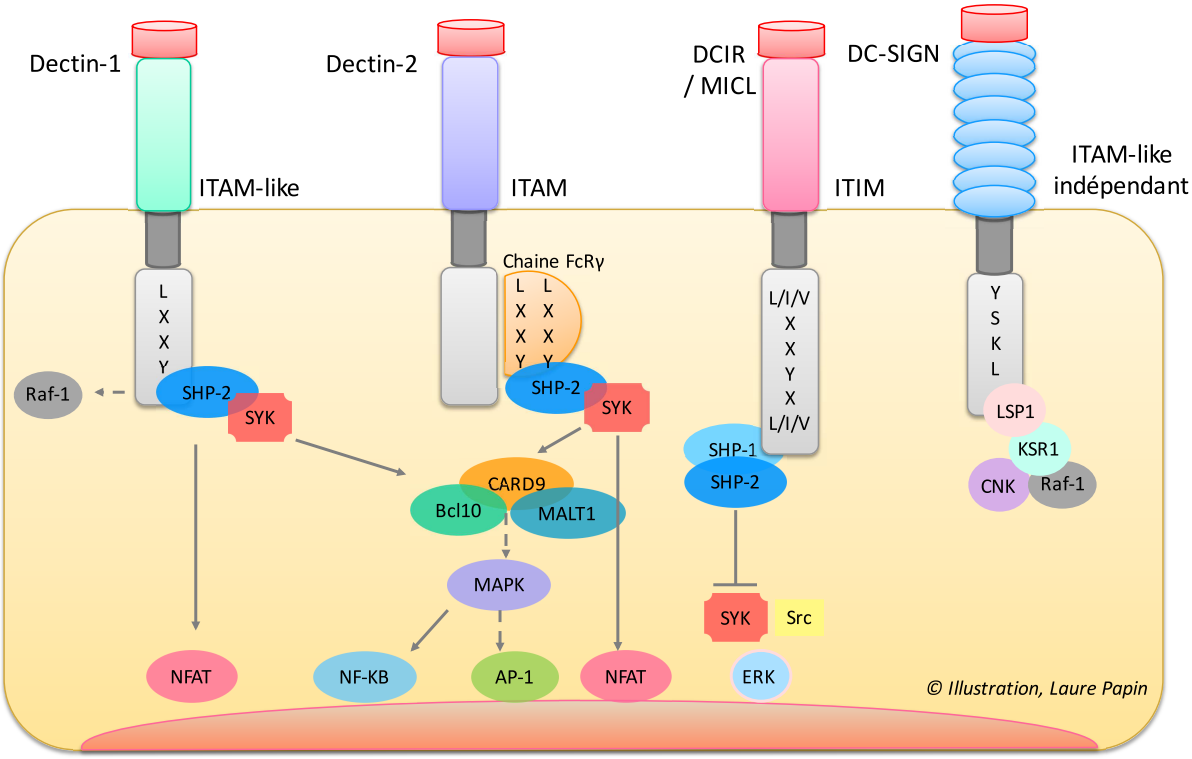


Illustration 8 - Les différentes voies de signalisations des CLR

•Le récepteur Dectin-1 possède un motif **ITAM-like** dans son domaine cytoplasmique. L'engagement du récepteur Dectin-1 humain par la levure *Candida albicans* va induire, via la chaine FcRγ à laquelle il est associé, le recrutement de la tyrosine phosphatase SHP-2 fonctionnant comme une plateforme et facilitant le recrutement de la tyrosine kinase SYK à la CLR Dectin-1 ou à l'adaptateur FcRγ [94,95]. SYK va alors induire le recrutement des protéines : CARD9 / MALT1 / BCL-10. Ce complexe va induire une voie de signalisation aboutissant à l'activation de certains facteurs de transcription tels que NF-κB, NFAT ou AP-1. Cela aura pour conséquence d'initier une réponse immunitaire anti-fongique (LTh17) et/ou pro-inflammatoire [96] (**illustration 8**).

•Le récepteur Dectin-2 exprime le motif **ITAM** et suite à la reconnaissance fongique semble générer la même signalisation que le récepteur Dectin-1 dépendante de SYK (recrutée par une chaine FcRγ associée à SHP-2) [97]. En revanche, la signalisation induite par le complexe CARD9-BCL-10-MALT1 active uniquement le complexe de transcription REL-p50 induisant la production de cytokines pouvant maintenir un contexte pro-inflammatoire mais insuffisant pour générer l'activation de LT helper. De manière surprenante, le récepteur des pDC, BDCA-2 (CD303) exprime aussi le motif ITAM associé à une chaine FcRγ mais la signalisation induite (via la BTK kinase et les protéines BLNK/Cγ2) semble inhiber l'expression de cytokines pro-inflammatoires [98] (**illustration 8**).

•Parmi les CLRs exprimant un motif **ITIM** il est possible de citer le récepteur DCIR (DC immuno-récepteur) [99],[100]. Généralement, lorsque les récepteurs contenant un motif ITIM sont engagés, ils sont phosphorylés sur l'acide aminé tyrosine contenu dans le motif ITIM, transmettant des signaux leurs permettant de recruter et d'activer les tyrosines phosphatase SHP-2 et SHP-1 [101]. Il en résulte une inhibition des réponses inflammatoires. La reconnaissance du VIH-1 par DCIR (Raji transduite avec DCIR et CD4) induit une signalisation dépendante de SHP-1 et 2 mais aussi SYK et Src kinases, qui ensemble contrôlent l'internalisation du VIH-1 et conduisent à l'activation PKC-α, p38 et Erk1 / 2 [102] (**illustration 8**).

•Le dernier groupe comprend toutes les autres CLR n'exprimant aucun de ces motifs ou dont la signalisation s'est révélée indépendante des motifs ITAM/ITIM. On retrouve notamment le récepteur DC-SIGN (« Dendritic Cell-Specific Intracellular Adhesion Molecules (ICAM)-3 Grabbing Non-Integrin ») qui possède un motif ITAM incomplet dans sa partie cytoplasmique et le récepteur CD207 qui lui est composé d'une région cytoplasmique riche en proline (**illustration 8**).

5.4. Le récepteur DC-SIGN

5.4.1. La découverte du récepteur DC-SIGN

Le nom du récepteur DC-SIGN provient du fait que le récepteur ait été caractérisé comme étant un récepteur capable de se lier aux ICAM-3 et -2 (Intercellular adhesion molecule) qui sont des récepteurs exprimés par les lymphocytes T et impliqués dans la liaison et l'adhérence cellule-cellule ainsi que dans la migration des DC [103,104]. Le récepteur DC-SIGN, aussi connu sous l'appellation CD209 (nom du gène), joue un rôle important dans la capture et l'internalisation des pathogènes contribuant ainsi à la maturation et à la migration des DC vers les organes lymphoïdes secondaires où elles présentent les antigènes aux lymphocytes T [105].

5.4.2. Expression cellulaire et localisation des cellules exprimant le récepteur DC-SIGN

Le récepteur DC-SIGN, est particulièrement exprimé *in vivo* à la surface de nombreux sous-types de cellules dendritiques telles que les cDC CD1c$^+$, les MoDC ainsi que certains sous-types locaux. Entre autre, on retrouve ces populations DC-SIGN$^+$ surtout au niveau du derme (sous-épithéliale), du placenta, des tissus périphériques et lymphoïdes et des muqueuses intestinales et génitales [103]. Par ailleurs, il est aussi exprimé par certain sous-types de macrophages (alvéolaires, CD14$^+$ dans le derme et les muqueuses mais pas par les pDC et les DC folliculaires [107]), de lymphocytes B et par les deux modèles de DC utilisés *in vitro* les MDDC et les DC issus de précurseurs CD34$^+$ [62,63]. Son expression est régulée par l'IL-4 [106]. Il existe un homologue de DC-SIGN, DC-SIGNR aussi appelé L-SIGN ou CD209L. Alors que DC-SIGN agit à la fois comme un récepteur pour les pathogènes menant à une réponse immune mais aussi comme une molécule d'adhésion cellulaire, l'homologue DC-SIGNR n'est doté que de la fonction de liaison des agents pathogènes. Cela peut s'expliquer par le fait que DC-SIGNR est principalement exprimé uniquement dans les ganglions lymphatiques, par les cellules endothéliales sinusoïdales du foie et le placenta [108,109] En revanche, DC-SIGNR et DC-SIGN partagent la même capacité de reconnaissance et de liaison aux oligosaccharides très riches en mannose, ils peuvent donc reconnaître les mêmes pathogènes [107,109].

5.4.3. Structure et internalisation (endocytose)

Le récepteur DC-SIGN est composé de 404 acides aminés (44kDa) et est un CLR de type II car son extrémité N-terminale se situe dans le cytoplasme. **L'illustration 9** illustre la représentation schématique du récepteur DC-SIGN.

•Le récepteur DC-SIGN comporte, comme tous les CLR, un domaine extracellulaire composé d'une **région de reconnaissance des sucres (CRD)**, liant de façon Ca2+ dépendante préférentiellement les structures hautement mannosylés ou fucosylés [110,111] (**illustration 9**). En plus de sa capacité de récepteur d'adhésion, le récepteur DC-SIGN a été décrit comme étant un récepteur du VIH-1 [105]. De manière intéressante, les récepteurs DC-SIGN et langerine possèdent un domaine CRD très similaire avec la présence du motif hautement conservé EPN et font partie du groupe des CLR de type II [112]. A l'heure actuelle, de nombreux et divers pathogènes intra ou extracellulaires tels que des virus, des bactéries, des champignons et des parasites, ont été décrit comme pouvant être reconnus par le récepteur DC-SIGN [107,113]. Le **tableau 4** résume les principaux pathogènes reconnus par DC-SIGN.

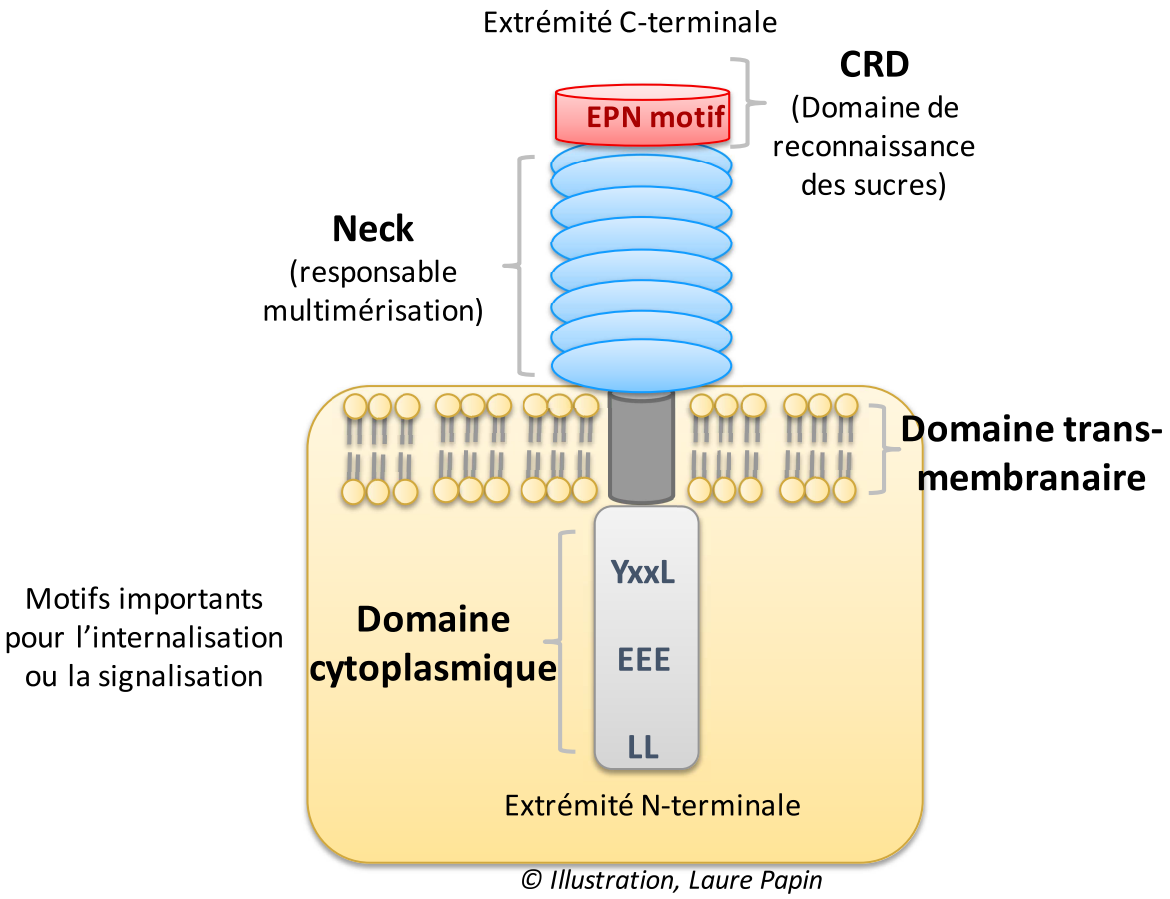


Illustration 9 - Représentation schématique du récepteur DC-SIGN

Pathogènes reconnus par le récepteur DC-SIGN	
Virus	VIH-1 / VIH-2 / SIV Dengue virus / Zika virus Measles virus Influenza A virus / SARS-CoV / Ebola virus / Marburg / Virus de West Nile Virus de l'hépatite B et C / herpes simplex virus / CMV Phlebovirus / Coronavirus
Bactéries	Mycobactéries *Helicobacter pylori* Lactobacillus *Klebsiella pneumonae*
Champignon	*Candida albicans*
Parasite	*Leishmania pifanoi* *Schistosoma mansoni*
Autres	ICAM-3/-2 des lymphocytes T Lewis X (Antigènes sanguin)

Tableau 4 - Les principaux pathogènes reconnus par DC-SIGN

•Le récepteur DC-SIGN est ensuite composé d'une région à motifs répétés en tandem de 23 acides aminés (sept complets, et un incomplet), permettant la multimérisation du récepteur (**illustration 9**). Cette région aussi appelé **région « neck »** permet au récepteur DC-SIGN une fois activé de s'organiser en tétramère formant ainsi à la surface des DC des nanoclusters [114]. La tétramérisation du récepteur est très importante pour les interactions récepteur-pathogène de différentes tailles mais aussi pour l'optimisation de la reconnaissance du ligand [109,115,116].

•Le récepteur DC-SIGN est enfin composé d'un **domaine transmembranaire** puis un **domaine N-terminal cytoplasmique** comportant des motifs d'internalisation, comme un motif di-leucine (LL), un motif tri-acidique (EEE), et un motif incomplet d'activation d'immunorécepteurs basé sur des tyrosines (ITAM-like) « YSKL » (**illustration 9**).
Le motif **di-leucine** est crucial pour l'endocytose du récepteur [117]. Cela a aussi été confirmé par la suite par d'autres équipes, en effet, malgré l'engagement du récepteur muté sur le motif LL par un anticorps, du ManLAM (Mannosylated lipoarabinomannan, provenant de la paroi des mycobactéries) ou la glyprotéine gp120 (VIH-1) celui-ci comparé au récepteur WT reste à la surface de la cellule au lieu d'être internalisé [118,119]. Cette mutation LL semble ainsi empêcher l'entrée dans la cellule de pathogènes tels que le virus de grippe, le VIH-1 ou encore *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Cependant, certains virus peuvent utiliser le récepteur DC-SIGN comme support de façon à améliorer leur infectivité. C'est le cas par exemple du virus de la dengue (DV) ou de la grippe (virus influenza A IAV) qui montrent une infectivité similaire avec des cellules exprimant des récepteurs DC-SIGN WT ou LL [118,120] ou du VIH-1 [105] (voir chapitre C.6.5). Cela implique que DC-SIGN peut être utilisé comme récepteur d'attachement permettant une possible association avec d'autres récepteurs cellulaires d'entrée des virus [121]. En terme d'endocytose les récepteurs mutés dans les domaines **tri-acidique** ou **« à base de tyrosine » (YSKL)** semblent se comporter comme le récepteur sauvage après engagement du récepteur. Ces deux motifs ne semblent pas être impliqués dans l'internalisation du récepteur [117,118]. Néanmoins, d'autres études ont montré qu'un motif tri-acidique, tel que celui présent dans la partie intracellulaire du récepteur lectine DEC-205 (EDE) régulerait l'adressage d'antigènes vers les endosomes tardifs ou les lysosomes et les réponses immunes CMH-II-dépendantes [122]. Concernant DC-SIGN, le motif EEE semble agir en tant que signal de tri dans les voies de sécrétions et un signal permettant le ciblage de la voie endocytose vers la voie lysosomale [119]. Ces données indiquent que DC-SIGN pourrait jouer un rôle central comme récepteur de pathogènes et qu'il possède un rôle important dans l'initiation des réponses immunes après internalisation de pathogènes.

5.4.4. Signalisation

Même si à l'heure actuelle la signalisation générée par l'engagement de DC-SIGN n'est pas totalement connue, quelques études ont permis de comprendre que selon le pathogène ou le contexte cellulaire,

la signalisation induite par le récepteur DC-SIGN pouvait différer. En effet, il semble que la signalisation de DC-SIGN soit étroitement liée à celle d'autres PRR, tels les TLR, reconnus simultanément par les pathogènes et permettant la génération d'une réponse immune adéquate [93]. L'étude de la signalisation du récepteur DC-SIGN a été réalisée en majeure partie par le groupe Néerlandais des Docteurs Gringhuis, Geijtenbeek et Van Kooyk. **L'illustration 10** représente la signalisation du récepteur DC-SIGN.

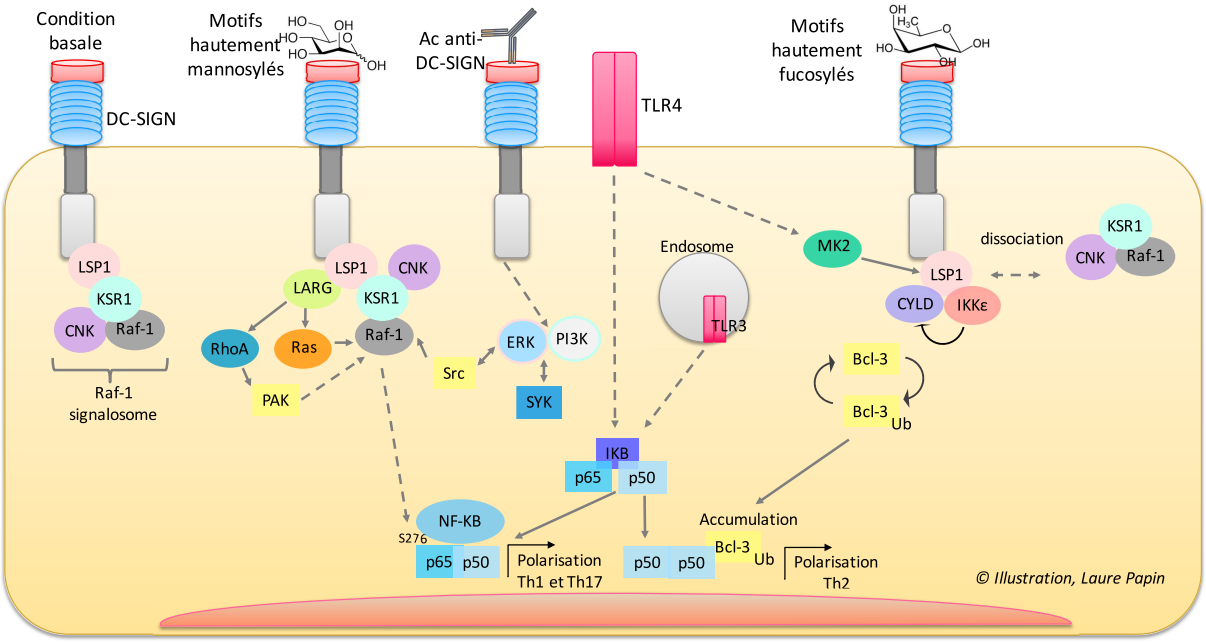


Illustration 10 - Représentation schématique de la signalisation du récepteur DC-SIGN

•Les premières études de la signalisation du récepteur DC-SIGN ont eu lieu lors de l'étude de l'interaction entre les DC et l'espèce bactérienne *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). En effet, le récepteur DC-SIGN reconnaît un composant hautement mannosylé de la paroi mycobactérienne, le lipoarabinomannane mannosylé (**ManLAM**) [123,124]. Bien que MTB cible le récepteur DC-SIGN pour infecter les DC et pour moduler les réponses immunes TLR dépendantes [124], l'étude de l'entrée des mycobactéries via DC-SIGN a permis de mieux comprendre la signalisation du récepteur. L'engagement de DC-SIGN par le ManLAM induit une cascade de signalisation impliquant l'activation de la serine/threonine kinase Raf-1 (RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase). La phosphorylation Raf-1 va induire la phosphorylation et l'acétylation de la sous-unité p65 (sérine276) de NF-KB. L'activation de Raf-1 par DC-SIGN ne dépend pas de la signalisation TLR, en revanche l'acétylation de p65 requière une activation préalable de NF-KB, qui elle dépend de la signalisation TLR [125]. L'activation de Raf-1 n'est pas restreinte à l'engagement médié par le ManLAM et l'engagement

de DC-SIGN par d'autres pathogènes comme le VIH-1 ou la levure *Candida albicans* peuvent aussi l'induire. De même que la modulation de la signalisation TLR par DC-SIGN n'est pas restreinte à TLR-4. Les signalisations issues des TLR -2 -3 -5 -8 peuvent aussi croiser la signalisation DC-SIGN dépendante [125–127]. Ces signalisations croisées TLR-DC-SIGN peuvent notamment mener à l'augmentation de la production de cytokine pro-inflammatoires (telle que l'IL-12p70) promouvant les réponses anti-infectieuses de type Th1 [127] à l'exception de la voie de signalisation induite par TLR-8 qui semble favoriser l'infection productive des DC par le VIH-1 [128]. Par ailleurs, deux études montrent que l'activation de Raf-1 semble être indépendante de l'implication du motif tyrosine-base de DC-SIGN [97,125]. Enfin, l'engagement de DC-SIGN dans les MDDC par un anticorps spécifique anti-DC-SIGN (MR1), montre d'une part l'activation de ERK et PI3K (phosphatidyl-inositol-3 kinase) deux kinases impliquées de manière critique dans la maturation des DC et d'autre part une association avec les tyrosine kinases des familles Src et Syk / ZAP-70 dans les MDDC et les cellules lymphoïdes transfectées [129]. Toutefois, ce n'est pas le cas lors de l'internalisation du récepteur par du ManLAM [125] (**illustration 10**).

•De façon similaire, la levure *Candida albicans* qui génère une activation synergique de DC-SIGN et Dectin-1 semble mener aussi à l'activation de Raf-1. Dectin-1 est la seule lectin de type C à pouvoir directement induire l'activation d'NF-KB suite à la reconnaissance d'un pathogène via la kynase SYK (comme décrit précédemment au paragraphe signalisation des C-type lectin à motif ITAM-like). Dectin-1 active NF-KB par la voie canonique via la sous-unité p65 mais aussi les voies non-canoniques via les sous-unités c-Rel et RelB. C'est grâce à cette dernière que Dectin-1 peut, tout comme DC-SIGN induire l'activation de Raf-1 en réponse anti-fongique et engendrer la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-1ß et l'IL-23 promouvant ainsi des réponses cellulaires anti-infectieuses Th1 et anti-fongique Th17 [96] (**illustration 10**).

•Par ailleurs, une autre étude concernant la signalisation du récepteur DC-SIGN a décrit qu'après internalisation du **VIH-1**, le domaine cytoplasmique du récepteur DC-SIGN est associé à la protéine LSP1 (leukocyte-specific protein 1). Cette étude montre ainsi que les motifs dileucine et « à base de tyrosine » (le mutant Δ35 est délété des deux motifs) sont impliqués dans cette interaction. La protéine LSP1 semble jouer un rôle important dans la dégradation du VIH-1 par le protéasome [130] bien que cet aspect n'ai jamais été approfondi par la suite (**illustration 10**). Récemment il a été décrit que LPS1 s'associe aussi à la langerine [131].

•Par la suite, au vu de l'ensemble des travaux préalablement accomplis sur la signalisation du récepteur DC-SIGN, l'étude de Gringhuis et al 2009, montre la présence d'un « signalosome » de DC-SIGN composé de quatre protéines LSP1-KSR1-CNK-Raf1 présent en condition basale. KSR1 est un membre de la famille des kinases suppresseur de Ras impliqué dans la cascade de signalisation ERK et CNK (PLK3 chez la drosophile) est une putative serine/threonine kinase. Selon la composition du ligand

reconnu par le récepteur DC-SIGN, la signalisation subséquente semble différer. En effet, la nature hautement **mannosylée du ManLAM** de MTB et de la **gp120 du VIH-1** (entre autres voir tableau 4) induisent le recrutement d'effecteurs tels que les GTPases LARG (« Rho guanine nucleotide–exchange factor ») et des RAS GTPases telles que RhoA (« ras homolog family member A »). L'activation de LARG après l'engagement de DC-SIGN (anticorps et VIH-1) a été décrite lors de l'étude du phospho-protéome de DC-SIGN dans les MDDC [132] et a été confirmée dans des expériences de transfert de l'infection VIH-1 vers des lymphocytes T [133]. LARG va pouvoir en amont, activer ces Ras-GTPases qui vont permettre à leur tour d'activer la kinase Raf-1 [93]. Une fois activée, Raf-1 va être recrutée par les autres protéines du signalosome de DC-SIGN (LSP1-KSR1-CNK) afin de moduler la réponse TLR-4 (activé par le LPS ou le ManLAM). Cette réponse va aboutir à l'expression d'IL -12 et -6 polarisant les réponses cellulaires Th1 et Th17 [127] (**illustration 10**).

•En revanche, la signalisation générée par la reconnaissance de **motifs fucosylés** de la bactérie *Helicobacter pylori* est indépendante de Raf-1 et mène à la dissociation du signalosome. DC-SIGN demeure associé à LSP1 contrairement au reste du complexe signalosome KSR1–CNK–Raf-1 [127]. Plus récemment, des précisions ont été apportées pour la signalisation après reconnaissance de motifs fucosylés. En effet, l'activation du TLR-4 (LPS) semble conduire à l'activation de la kinase MK2 qui va phosphoryler LSP1. Cette phosphorylation va permettre le recrutement des kinases IKKε et déubiquitinylase CYLD au complexe DC-SIGN-LSP1. Leurs activités vont mener à une accumulation d'une ubiquitine ligase Bcl3 dans le noyau aboutissant à la diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12, -6 et -23 et favoriser celle de l'IL-10 [111]. Un contexte peu propice à l'établissement de l'immunité anti-infectieuse et favorisant ainsi la persistance de la bactérie *Helicobacter pylori* au détriment des réponses immunitaires. Cela suggère aussi que DC-SIGN pourrait jouer un rôle dans l'homéostasie immunologique puisque cette voie entraîne aussi la modulation des profils d'expression de cytokines et de chimiokines induites par les TLR pour favoriser les réponses des cellules Th2 (**illustration 10**).

<u>Conclusion sur la signalisation de DC-SIGN</u> : Le récepteur DC-SIGN est un récepteur de reconnaissance des pathogènes doté de capacités d'endocytose de pathogènes très variées et agissant aussi comme un immuno-modulateur du système immunitaire [107]. Il est donc évident que la signalisation du récepteur DC-SIGN varie en fonction de la nature du ligand reconnu et de l'état d'activation cellulaire [134]. En effet, la signalisation générée par la reconnaissance concomitante de pathogènes par des autres PRR tel que les TLR semble étroitement liée à celle de DC-SIGN. Il apparaît que le récepteur DC-SIGN peut être utilisé et détourné de ses fonctions premières par les pathogènes de façon à améliorer et à propager leur infection, voir le chapitre C.6.5.

5.5. Les cellules dendritiques sont des phagocytes capables de capturer et dégrader les pathogènes

Lorsque l'on considère le terme « entrée » au sens plus général, il est important de considérer du point de vue de la cellule mais aussi du pathogène. En effet, les PRR peuvent servir de porte d'entrée pour les virus ou même de point d'attachement pour se concentrer à la surface cellulaire comme le virus de la dengue, de la grippe ou encore le VIH-1 [105,118,120].

L'endocytose est un mécanisme cellulaire ancestral essentiel, la majorité des cellules de l'organisme en sont capables (**illustration 11**). L'endocytose est réalisée par la membrane plasmique et permet globalement l'entrée de particule ou de fluide extracellulaire dans la cellule. Le terme d'endocytose fut créé par le Docteur Christian de Duve en 1963 afin de désigner l'internalisation dans la cellule [135]. On parle de phagocytose lorsqu'il s'agit de l'ingestion de grosses particules (>0,50 µm de diamètre) ou de pinocytose lorsqu'il s'agit d'un fluide ou d'une macromolécule. Certaines cellules du système immunitaire comme les neutrophiles, les monocytes, les macrophages ou les DC sont des phagocytes. Les macrophages sont reconnus comme étant les **phagocytes** les plus performants en terme de quantité et de rapidité de matériel internalisé [136]. Par exemple, lorsqu'un pathogène est reconnu et pris en charge par des anticorps qui lui sont spécifiques, le complexe formé peut alors être reconnu par les Fc récepteurs exprimés par les phagocytes. Les Fc récepteurs reconnaissant les chaines lourdes des immunoglobulines (Ig), s'en suit alors un processus dynamique d'opsonisation consistant en la formation d'excroissance de la membrane plasmique (pseudopode) permettant d'encercler le complexe dans la cellule, la vésicule formée est alors appelée phagosome. Concernant la **pinocytose** l'entrée peut être aspécifique (la macropinocytose) ou impliquer des récepteurs spécifiques on peut alors parler d'**endocytose** à récepteur. Des petites vésicules vont alors se former telle une invagination de la membrane plasmique afin de séquestrer les molécules reconnues par les récepteurs. Cette endocytose peut alors impliquer de la clathrine, de la cavéoline ou des mécanismes indépendants de clathrine et cavéoline [137]. Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux CLR sont dotés de capacité d'endocytose spécifique, c'est le cas du récepteur **DC-SIGN** qui induit la formation de vésicules recouverts de clathrine lors de l'internalisation du VIH-1 [138] (**illustration 11**).

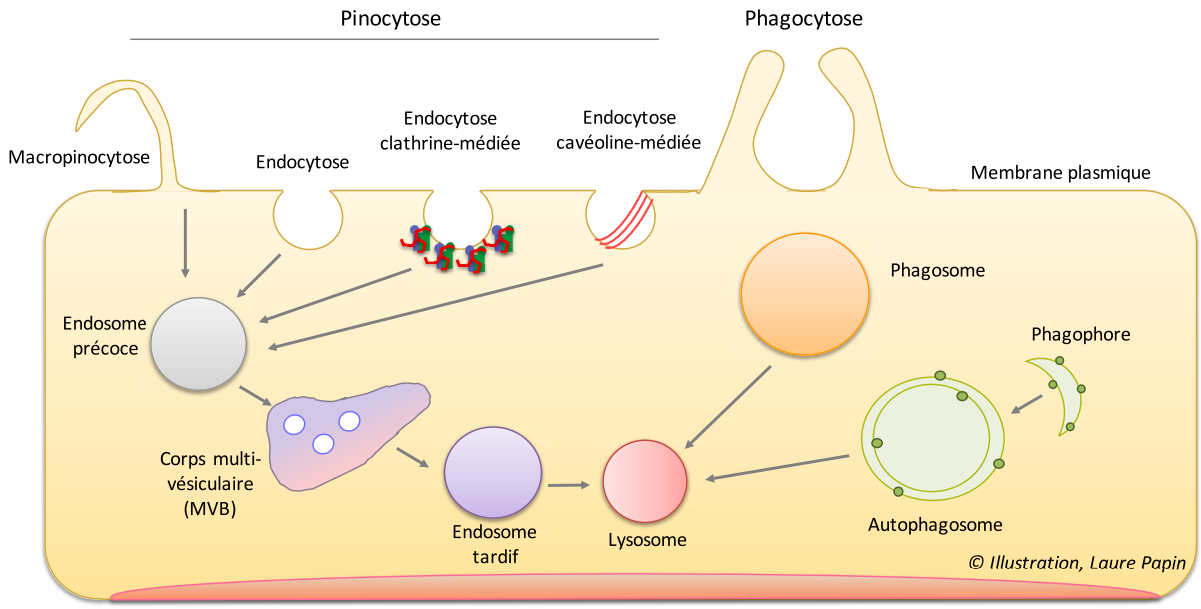


Illustration 11 - Rôle central des lysosomes dans le devenir des vésicules de dégradation

Comme décrit précédemment, certaines études montrent que la signalisation engendrée par les récepteurs de capture des pathogènes est étroitement liée à la nature des antigènes reconnus et peut par conséquent, varier en fonction du pathogène. Ainsi, selon l'épitope ciblé, l'adressage et l'internalisation peuvent différer et ainsi emprunter des voies distinctes. Concernant DC-SIGN, des études menées par le Docteur Tacken *et coll.* ont montrées que lorsque le récepteur DC-SIGN était engagé par le CRD par des **anticorps ou par des ligands saccharidiques naturels**, le récepteur et son ligand étaient internalisés de façon clathrine dépendante vers des endosomes tardifs puis vers la voie lysosomale et enfin vers des compartiments exprimant des récepteurs du CMH de classe II. Par contre, l'engagement du récepteur par la région neck engendrait, en revanche, une internalisation du récepteur de façon clathrine indépendante vers des compartiments endosomaux précoces ainsi que des compartiments exprimant des récepteurs du CMH de classe I [139]. Par ailleurs, l'internalisation du VIH-1 via le récepteur DC-SIGN dépend d'un mécanisme d'endocytose dépendante de la clathrine [138].

Selon la nature du ligand, il va y avoir formation de phagosome ou d'endosomes précoces, ensuite grâce aux ATPases H^+ (pompes à protons) ces vésicules vont devenir mature en endosomes tardifs et le pH va devenir acide [135]. D'autre vésicules de dégradation peuvent séquestrer du matériel cytoplasmique y compris des pathogènes au vu de leur destruction. C'est le cas par exemple des vésicules faisant parties du mécanisme de l'autophagie, les autophagosomes (l'autophagie fait l'objet d'un chapitre complet ci-après, cf. chapitre D) [140]. Par ailleurs, on peut retrouver deux types d'endosomes précoces, les endosomes de tri dont le rôle est d'acheminer le substrat vers la dégradation lysosomale et les endosomes de recyclages qui sont interconnectés et qui ont majoritairement pour rôle de réexpédier les récepteurs endocytés vers les membranes plasmiques

(**illustration 11**). En fonction du récepteur, le recyclage peut être plus ou moins intense et rapide, concernant le récepteur DC-SIGN il a été décrit comme étant très rapide, le VIH-1 est retrouvé dans des compartiments acides dès 5-10 minutes d'internalisation du récepteur [141,142], DC-SIGN et les particules de Phlébovirus sont séparées dans l'endosome précoce 20 min après l'absorption [143]. Les endosomes tardifs peuvent fusionner avec de nombreuses vésicules, formant une grande vésicule appelée corps multi-vésiculaire (MVB). Le trafic des vésicules d'endocytose est notamment contrôlé par la superfamille des petites protéines G (Rho-GTPases : Ras homologous) comme les Rab (Ras-related in Brain) protéines, par exemple, les endosomes précoces Rab5, 14, les vésicules à clathrine Rab5, les endosomes de recyclage Rab4, 11, endosomes tardifs Rab7, 9 [144]. Les protéines protéines SNARE (Soluble N-éthylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor) sont aussi impliquées dans le trafic vésiculaire. Plus précisément, les protéines transmembranaires SNARES sont les principales protéines régulant les fusions vésiculaires et le trafic membranaire cellulaire. Ces protéines sont classées en deux sous-groupes complémentaires : les v-SNARES (vésiculaires) et les t-SNARES (target/cibles) sont localisées respectivement dans la membrane du compartiment donneur ou accepteur. Aussi, les SNARES riches en certains acides aminés sont parfois nommés en conséquence, on retrouve alors les R-SNARES (argine) ou encore les Q-SNARES (glutamine). Les endosomes tardifs, les MVB, les autophagosomes ou les phagosomes nouvellement formés peuvent finalement fusionner avec des **lysosomes** de façon à dégrader leur contenu [135]. **L'illustration 11** résume le rôle central des lysosomes dans le devenir des vésicules de dégradation. Les lysosomes contiennent des enzymes leur permettant de dégrader le contenu des vesicules dans lesquelles elles sont déversées, par exemple les cathépsines B et D qui sont des protéases.

Du fait de leur large éventail de récepteurs exprimés en surface, les **DC immatures** possèdent de très grandes capacités de reconnaissance et d'internalisation des pathogènes. Après prise en charge d'un pathogène, les DC vont s'activer progressivement réduisant ainsi leur capacité d'endocytose tout en augmentant fortement leur activité protéolytique et d'apprêtement d'antigènes sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) [41,145].

5.6. Activation, maturation et migration des DC en réponse aux pathogènes

Une fois le pathogène reconnu et internalisé, les DC sont **activées**, elles vont alors entrer dans un programme de **maturation**. Lors de la maturation les DC vont évoluer autant sur le plan phénotypique que fonctionnel.

5.6.1. La maturation des cellules dendritiques

Sur le plan phénotypique, la maturation des DC implique une diminution d'expression de nombreux récepteurs (PRR) impliqués dans la capture des pathogènes tels que MR, DCIR et DC-SIGN chez les MDDC, la langerine chez les LC [85]. Cela a pour conséquence de diminuer les capacités d'endocytose des DC. Par exemple, les cDC, les LC, et MDDC, expriment de faibles niveaux de DEC-205, mais l'expression augmente nettement lors de l'activation, ce qui indique que le DEC-205 est une molécule associée à l'activation [122]. Lors de la maturation des DC on peut aussi constater une surexpression en surface des molécules du CMH-I et CMH-II. En effet, les DC immatures expriment des quantités considérables de CMH de classe II dans des compartiments endosomaux et au niveau de la membrane plasmique, alors que pour les DC matures la grande majorité du CMH de classe II est présente à la surface des cellules [146]. On observe aussi une augmentation d'expression des molécules de co-stimulation telles que les récepteurs CD40, CD80 CD86 et certains récepteurs d'adhésion [145]. Ces récepteurs permettent notamment d'assurer le contact entre la DC et les lymphocytes T (LT) et dans le cas où un antigène est associé aux molécules du CMH face au TCR (récepteur des LT), se forme la synapse immunologique. D'ailleurs, un des premiers rôles décrit du récepteur DC-SIGN est son rôle dans la liaison DC-LT car il se lie à l'ICAM-3 qui est un récepteur des LT permettant la liaison transitoire durant la synapse immunologique. Cette liaison stabilise la zone de contact entre les deux cellules [103]. Enfin, globalement les DC en cours de maturation vont évoluer sur le plan morphologique par une réorganisation de leur cytosquelette conduisant notamment à l'extension des dendrites [41]. **Au niveau fonctionnel**, la maturation des DC va engendrer la sécrétion des cytokines qui vont assurer une réponse immune adaptée en fonction du contexte inflammatoire [41].

5.6.2. La migration des cellules dendritiques

Une fois activées et en cours de maturation, les DC migrent du site de l'inflammation vers les ganglions lymphatiques où elles vont achever leur maturation. Le récepteur CCR7 (récepteur de chimiokine de ciblage vers les ganglions lymphatiques) est très important durant la migration des DC car il reconnaît CCL19 et CCL21 qui sont deux chimiokines capables de guider les DC vers des sites riches en LT comme les organes lymphoïdes secondaires. [147]. Le récepteur DC-SIGN est aussi impliqué dans la migration des DC notamment grâce à sa capacité à se lier à l'ICAM-2 [103,104].

5.7. L'apprêtement et la présentation antigénique

Le processus de maturation des DC va leur permettre de devenir des cellules présentatrice d'antigène (CPA). Comparé aux lymphocytes B (LB) et aux macrophages qui sont aussi des CPA, les DC sont considérés comme étant des CPA professionnelles en partie parce que leurs compartiments endo/lysosomaux tardifs sont moins protéolytiques, limitant ainsi la destruction complète des

antigènes internalisés et favorisant la génération de peptides antigéniques [136]. De plus, contrairement aux autres CPA les DC possèdent la capacité de présenter des antigènes aux lymphocytes T naïfs et ainsi induire l'expansion clonale spécifique de l'antigène [148]. Les molécules responsables de la présentation antigénique sont les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ; correspondant au HLA (Human Leucocyte Antigen HLA) chez l'Homme ; permettant la présentation des antigènes protéiques et les CD1 permettant la présentation des antigènes lipidiques. Les LC expriment particulièrement le CD1a et les cDC expriment le CD1b. Toutes les cellules nucléées expriment le CMH-I, en revanche le CMH-II et les CD1 sont principalement exprimés par les CPA. Le chargement sur les molécules CMH de classe I (CMH-I) ou de classe II (CMH-II) permet respectivement la présentation des antigènes et l'activation des lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques ou $CD4^+$ auxiliaires [149].

•Les **antigènes endogènes** issus de la dégradation de protéines cellulaires cytoplasmiques ou nucléaires peuvent être dégradés par le protéasome ubiquitaire ou immunoprotéasome pour les APC [150]. Le protéasome est un complexe protéique composé de deux sous-complexes : le 20S et le 19S. L'ensemble forme le protéasome 26S possédant un site actif interne et permettant la dégradation de protéines cellulaires à courte durée de vie, endommagées ou incorrectement repliées et toutes préalablement ubiquitinylées [151]. On parle aussi du système Ubiquitine-Protéasome (UPS) [152]. Les peptides issus de la protéolyse par le système UPS vont être transportés vers le réticulum endoplasmique (RE) grâce à un système de transport dépendant des protéines TAP-1 et -2 (ATP-dépendant). Une fois à l'intérieur du RE, les peptides vont s'associer aux molécules du CMH-I. Le complexe peptide/CMH-I quitte alors le site de chargement des peptides dans le RE pour transiter vers l'appareil de Golgi où ils seront adressés vers la membrane plasmique où ils seront présentés par les molécules du CMH-I aux LT CD8.

•Au cours du processus d'endo/phagocytose, des peptides peuvent être libérés dans le cytosol, les APC et particulièrement certaines sous-populations de DC sont aussi capables de charger ces peptides dérivés d'antigènes exogènes sur des molécules de CMH de classe I. Notamment les cDC humaines BDCA-3^+ et -1^+ et les pDC [153–155]. Cela est définit comme étant la **présentation croisée.** Ce mécanisme est essentiel par exemple pour l'initiation de réponses immunitaires à certains virus qui n'infectent pas les cellules présentatrices d'antigènes et ainsi pour l'initiation de la réponse LT CD8 cytotoxique [156].

•Les **antigènes exogènes** internalisés sont traités par la voie phago/endosomale puis dégradés par voie lysosomale, comme décrit précédemment, pour la formation de peptides exogènes pouvant être présentés par les molécules CMH de classe II [157]. Ces peptides exogènes vont être acheminés vers des vésicules issues de l'appareil de Golgi contenant des molécules du CMH-II provenant du RE, on parle de compartiment CMH-II (MIIC) ou compartiment antigénique. Les molécules du CMH-II contenues

dans ces compartiments sont associées à une protéine Ii (Invarian Chain) ayant pour rôle de favoriser la sortie du RE et d'empêcher la fixation de protéines autres que les peptides antigéniques [149]. Une fois la reconnaissance peptide exogène-CMH-II réalisée, ce complexe va migrer jusqu'à la surface cellulaire ou il va être présenté aux LT CD4 auxiliaires afin d'orienter la réponse immune adaptative. Tous les sous-types de DC sont capables de présentation exogènes, en revanche les pDC sont moins efficaces cela peut notamment être expliqué par leur plus faible capacité de phagocytose [146]. Enfin, l'autophagie joue aussi un rôle important dans l'apport d'antigènes exogènes au vu de la présentation antigénique [158,159].

5.8. Orientation et polarisation de la réponse immunitaire

Une fois que le peptide antigénique est présenté à la surface des APC par la molécule CMH/HLA adéquate, s'initie alors la réponse immunitaire adaptative. Etant donné que les DC migrent vers les ganglions lymphatiques pour terminer leur maturation et présenter les Ag aux LT c'est généralement ici que s'opère la rencontre entre la DC et les LT naïfs. Parfois, le contact peut aussi se dérouler sur le lieu de la réponse inflammatoire par l'intermédiaire de LT effecteurs ou mémoires préalablement activés [149]. Dans tous les cas, un complexe ternaire doit être constitué entre les APC et le LT. Ce complexe constitué de plusieurs récepteurs s'appelle la synapse immunologique [160]. La première étape de cette synapse immunologique est la reconnaissance du peptide antigénique présenté par le CMH et le récepteur des lymphocytes T TCR (CD3), cette liaison est renforcée et stabilisée par la molécule CD4 reconnaissant le CMH-II ou CD8 le CMH-I. Ce premier signal est suffisant pour l'activation des LT effecteurs mais ce n'est pas le cas des LT naïf qui eux nécessitent un deuxième signal délivré par la CPA. Si le deuxième signal n'a pas lieu la reconnaissance de l'antigène conduit à un état de non-réponse (l'anergie) ou une différenciation en T régulateur (T reg) inhibant les réponses immunitaires [161]. Le deuxième signal est produit par l'interaction entre deux récepteurs la molécule CD80 ou CD86 exprimé par la CPA et CD28 du LT. Le deuxième signal induit une stimulation réciproque des deux cellules, induisant par exemple la synthèse du récepteur CD40L qui va être reconnu par le CD40 des DC [162]. D'autres récepteurs sont connus pour stabiliser la synapse immunologique durant le contact DC-LT comme les récepteurs de LT : CD2, LFA-1, ICAM-3 qui reconnaissent spécifiquement chez la DC les récepteurs LFA-3, ICAM-1 et DC-SIGN [103,163]. A l'issu de ces interactions d'autres signaux sont alors sécrétés : des cytokines polarisant et orientant la réponse immune. Lorsque les LT se séparent des DC ils deviennent pour les LT CD4 des lymphocytes Helper (Th) et les LT CD8 des LT cytotoxiques. Sous l'action de l'IL-2 les LT qui ont été spécifiquement activés vont proliférer, se multiplier c'est l'expansion clonale des lymphocytes. En fonction de la nature du danger les DC vont produire différentes cytokines qui vont orienter la différentiation des LT helper. Ainsi sous l'influence de l'IL-12 ils deviennent des Th1, de l'IL-4 des Th2, de l'IL-6 et du TGF bêta des Th17 [164–166]. Ces sous-groupes de cellules Th ont chacun des rôles spécifiques dans la défense contre les agents pathogènes en aidant d'autres cellules

immunitaires à générer des réponses efficaces contre l'agent infectieux. Les réponses des lymphocytes Th1 et Th2 sont importantes pour la défense de l'hôte contre les pathogènes intracellulaires et extracellulaires, respectivement. Les réponses générées par les Th17 sont cruciales dans un contexte d'infection mycosique [164–166].

CHAPITRE C : INTERACTION ENTRE LES CELLULES DENDRITIQUES ET LE VIH-1

6. L'ENTREE DU VIH-1 DANS LES CELLULES DENDRITIQUES

Comme décrit précédemment dans le chapitre A.3.1, le VIH-1 est capable théoriquement d'infecter toute cellule exprimant le récepteur CD4 ainsi que les corécepteurs CXCR4 et/ou CCR5 à sa surface. Concernant les cellules dendritiques, nous avons évoqué dans le chapitre B leur rôle de cellules sentinelles du système immunitaire dotées d'une grande capacité de dégradation phagocytaire et possédant de nombreux récepteurs et senseurs cytoplasmiques leur permettant de détecter les pathogènes et signaux de danger. Certains sous-types de cellules dendritiques sont considérés comme étant les premiers à reconnaître et à capturer le VIH-1 dans l'organisme du fait de leur présence dans des zones propices à l'infection telles que les couches mucosales supra-basales. Etant une des populations cellulaires la plus précocement exposée aux pathogènes, les DC possèdent de fortes capacités d'endocytose liées aux processus de dégradation ainsi que des facteurs cellulaires leurs permettant de détecter et parfois restreindre la réplication d'agents infectieux. Toutefois, les virus évoluent aussi génétiquement et peuvent avoir développé différents moyens d'échapper aux défenses de l'hôte tout en exploitant ou en détournant certains mécanismes cellulaires afin de mieux se répliquer et se propager. Un modèle en trois phases a été proposé par de nombreux articles (**illustration 12**). Pendant les premières 24H, le VIH-1 est internalisé dans les DC (plusieurs modes d'entrées possibles détaillés ultérieurement) et une grande majorité de la charge virale est très rapidement dégradée. Il a été proposé que le faible pourcentage de virions restant non dégradé pouvait se retrouver compartimentalisé dans les cellules et être transmis aux lymphocytes T $CD4^+$, processus étant appelé la *trans*-infection. Lors de la deuxième phase, comprise entre 24-72 heures post-exposition, le virus se réplique et produit de nouveaux virions à condition de passer outre les nombreuses restrictions cellulaires. Au-delà de 72H après l'exposition au virus, on commence à observer une phase appelée la transmission à « long-terme » ou *cis*-infection qui dépend d'une réplication virale productive dans les DC et qui se traduit par la transmission de virions infectieux néo synthétisés aux LT $CD4^+$ et qui amplifie ainsi la propagation de l'infection. Dans ce chapitre, nous traiterons du devenir du virus dans les DC. Plusieurs devenirs du VIH-1 dans les DC ont été décrits dans la littérature néanmoins les liens et la chronologie entre ces différentes possibilités demeurent encore souvent obscurs, tout comme l'influence de la signalisation récepteur-dépendante après l'entrée du VIH-1 dans les DC. **L'illustration 12** synthétise le devenir du VIH-1 une fois entré dans la DC.

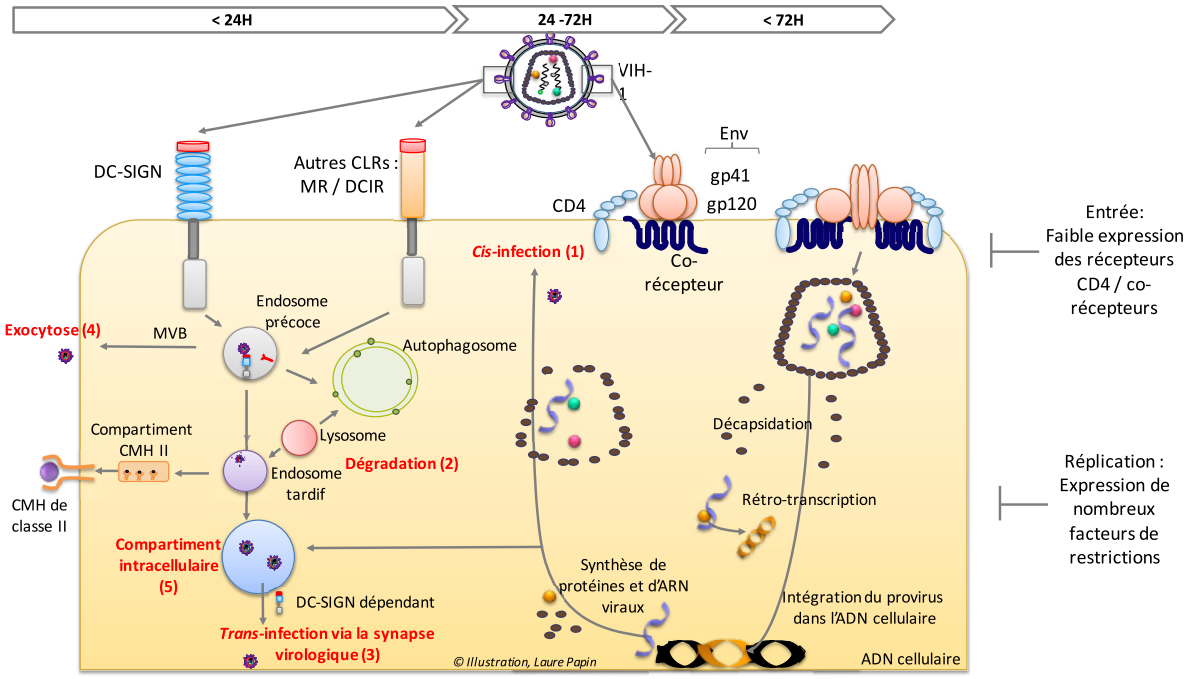


Illustration 12 - Les différentes voies d'entrées du VIH dans les DC

6.1. La susceptibilité des DC à l'infection par le VIH-1

6.1.1. La *cis*-infection

La *cis*-infection ou infection en *cis* correspond à la transmission de l'infection à partir d'une cellule productivement infectée [167] (**illustration 12, 1**). Les différents sous-types de cellules dendritiques expriment des niveaux relativement faibles en récepteurs du VIH-1 : CD4 et corécepteurs CXCR4 et CCR5 [168]. Malgré cette faible expression, la plupart des sous-types de DC sont donc théoriquement susceptibles à l'infection par des souches de VIH-1 à tropisme X4 et R5 : les LC [169], les pDC et les cDC [170,171] ainsi que le modèle le plus utilisé pour l'étude des DC dans un contexte inflammatoire les MDDC [159,172]. Au cours de l'infection chronique par le VIH-1, il est observé un déclin des pDC dans le sang en corrélation avec une charge virale élevée [173]. L'infection des pDC par le VIH-1 entraîne une production d'IFN, même si dans ces cellules, l'infection productive est très inefficace et la réplication virale est limitée (1-2 logs plus bas que dans les lymphocytes T) [170]. En l'absence de traitement, des DC infectées de patients contaminés par le VIH-1 ont aussi été retrouvées dans le sang ce qui confirme la susceptibilité *in vivo* des DC au VIH-1 [174]. Globalement le VIH-1 se réplique 10-100 fois moins dans les DC comparé aux LT $CD4^+$ [170,172,175]. Cette **très faible susceptibilité des DC à l'infection productive par le VIH-1** peut être expliquée non seulement par leur faible expression du récepteur du VIH-1 mais aussi par le fait que les DC expriment de nombreux facteurs cellulaires inhibant la réplication virale (chapitre C.7.1.2). Les cDC et MDDC expriment globalement plus de corécepteurs CCR5 que de CXCR4 ce qui pourrait expliquer le fait que les virus à tropisme R5 les infectent plus efficacement. Comparé aux cDC

(CD11c$^+$), les pDC semblent moins susceptibles à l'infection par le VIH-1 à tropisme R5 [170]. Seule l'entrée du virus via les récepteurs CD4 et les corécepteurs permet l'infection **productive** des DC, c'est à dire production de nouveaux virions [19].

6.1.2. La maturation influence la susceptibilité des DC à l'infection par le VIH-1

La maturation semble jouer un rôle dans la variation de susceptibilité de l'infection des DC par le VIH-1. Il est possible d'obtenir des DC matures (mDC) *in vitro* par la mise en contact des DC avec des ligands de PRR tels que le poly-IC (TLR-3), CD40L (CD40 ou encore plus couramment et efficacement du LPS (TRL4) [176,177]. Selon le ligand utilisé pour la maturation, l'expression en surface des corécepteurs CCR5/ CXCR4 ainsi que du récepteur CD4 peut varier influençant ainsi l'entrée virale et donc l'infection des DC [177]. Globalement, la maturation des DC semble leur conférer une protection vis-à-vis de l'infection par le VIH-1 du fait de la diminution d'expression des récepteurs en surface mais aussi du fait de la diminution des capacités endocytiques des DC matures [85]. Aussi, il a été décrit par plusieurs équipes que les DC infectées productivement par le VIH-1 s'activent en fait très faiblement, ne deviennent pas totalement matures et possèdent donc de plus faibles capacités d'activation des LT naïfs que des mDC non infectées productivement ou des DC immatures iDC [178–180]. Toutefois, malgré la diminution d'expression du récepteur DC-SIGN, la maturation induit une capture et une transmission virale plus intense [181]. C'est ainsi qu'il a été découvert que certains récepteurs lectine de type I, reconnaissant les glycolipides membranaires (gangliosides) contenant du sialyllactose [83] pouvaient favoriser la propagation virale lors de contacts avec les LT CD4$^+$ [182] (voir le chapitre C.6.5.1).

6.2. L'entrée du VIH-1 par les récepteurs lectine de type C

Il est actuellement considéré que les CLR sont responsables de 80% de l'entrée du VIH-1 dans les DC [168,183]. L'entrée médiée par les CLR dépend d'une endocytose clathrine- ou cavéoline-dépendante, mais aboutit néanmoins rarement à une infection productive de la cellule [138,184]. Au vu de la grande hétérogénéité de la population de DC ainsi que la diversité des CLR exprimés, aucun CLR n'est à lui seul responsable de l'entrée du VIH-1 dans les DC [168,185]. A l'heure actuelle, on recense plusieurs CLR exprimés par les DC capables de reconnaître et lier la gp120, parmi lesquelles : CD207 (langerine) dans les LC, MR (mannose récepteur), DCIR et DC-SIGN (**tableau 3 chapitre B.5.3.1 et tableau 5 ci-après**).

Lectines reconnaissant le VIH	Expression cellulaire
DC-SIGN (CD209)	MDDC
DCIR	LC / MDDC / cDC
Mannose récepteur (CD206)	MDDC / cDC
Langerine (CD207)	LC
DEC205 (CD205)	LC / MDDC / cDC
BDCA2	pDC
BDCA4	

Tableau 5 - Récepteurs lectine de type C exprimées par les cellules dendritiques capable de reconnaître le VIH-1

En effet, il a été décrit qu'inhiber l'expression de DC-SIGN (shRNA) dans les DC [186] ou en bloquant l'accès du VIH-1 aux MR et DC-SIGN (mannane, anticorps neutralisants) dans les DC et THP-1 DC-SIGN [187] n'empêche pas la capture et la transmission du virus aux LT $CD4^+$ [188]. Voici différents exemples de la littérature sur le rôle de certains de ces CLR vis-à-vis de l'infection par le VIH-1 :

•Comme évoqué précédemment, une des premières populations de DC à rencontrer le VIH-1 dans un contexte d'infection sexuelle sont les sous-types de DC résidents des muqueuses telles que les LC. De façon très intéressante différents groupes ont décrit que le VIH-1 ne pouvait pas infecter productivement ces cellules sauf dans le cas où la fonction de la **langerine** est altérée ou en cas d'infection avec des titres viraux très élevés [169,189]. Cela suggère que la langerine agit comme une barrière naturelle à l'infection par le VIH-1. Aussi, les LC dégradent efficacement le VIH-1 dans des compartiments cellulaires qui leurs sont propres, les granules de Birbeck après une internalisation cavéoline dépendante [169,190]. Les LC sont particulièrement réfractaires à l'infection et cela semble lié à l'expression de CLR langerine, mais à l'heure actuelle les facteurs cellulaires responsables de la restriction de l'infection sont toujours en cours d'investigation, il a néanmoins été montré qu'il ne s'agissait ni de SAMHD1, ni de MX2 [189]. Très récemment, il a été décrit que la diminution d'expression (par siRNA) du facteur de restriction antiviral TRIM5α humain augmente de manière significative l'infection des LC primaires via la langerine suggérant un important rôle de ce facteur dans la résistance des LC à l'infection par le VIH-1 [131].

•Une fois le VIH-1 reconnu, le **mannose récepteur** (MR) achemine ses ligands vers des compartiments endo-lysosomaux [191]. Néanmoins, le MR peut aussi favoriser la transmission du VIH-1 aux LT $CD4^+$ dans un système de co-culture [192]. Le MR est aussi exprimé par les pDC [193], les macrophages, les LC et les DC dermiques $CD14^+/CD1a^{low}$.

•Le récepteur **DCIR** est aussi un récepteur cellulaire d'attachement pour le VIH-1 sur les DC et l'expression de DCIR à la surface des LT $CD4^+$ peut être induite par le VIH-1 [194]. Cette expression accrue de DCIR par les lymphocytes T CD4 + améliore l'attachement, l'entrée, la réplication et le transfert du VIH-1, ce qui entraîne une plus grande propagation du virus [102].

•Concernant les pDC, la liaison à la gp120 et la reconnaissance du VIH-1 semble principalement médiée par le récepteur CD4, malgré l'expression le CLR BDCA-2 par les pDC [195].

6.3. L'entrée du VIH-1 par le récepteur DCSIGN

Le récepteur DC-SIGN reconnaît la partie hautement mannosylée de la gp120 du VIH-1 et permet ainsi l'entrée du VIH-1 dans les DC [105,121,196] (**illustration 12, partie gauche**). Ce récepteur peut aussi reconnaître et permettre l'entrée de la plupart des Lentivirus dont le VIH-1, le VIH-2 et le SIV [142,197,198]. L'attachement du VIH-1 au récepteur DC-SIGN peut favoriser les interactions glycoprotéiques entre le récepteur CD4 et la gp120 et ainsi améliorer l'entrée pour favoriser l'infection productive des DC immatures [20,199]. Aussi, DC-SIGN est important pour la réplication du VIH-1 dans les MDDC [128]. Néanmoins, une autre étude montre que DC-SIGN pourrait rentrer en compétition avec le récepteur CD4 et ainsi diminuer le niveau d'infection [121]. Par ailleurs, dans les cellules Raji (lignée de LB), la surexpression du récepteur CD4 inhibe de manière significative la transmission du VIH-1 médiée par DC-SIGN vers les LT $CD4^+$. En revanche, la surexpression simultanée de DC-SIGN et de CD4 favorise la rétention intracellulaire du VIH-1, ce qui suggère que CD4 inhibe la transmission du VIH-1 médiée par DC-SIGN aux cellules LT $CD4^+$ en provoquant l'internalisation du virion, plutôt que la rétention du VIH-1 à la surface de la cellule [200]. Nous verrons par la suite que ce récepteur est fortement impliqué dans le transfert viral, mais est surtout important dans l'acheminement des virions entrant vers la dégradation.

6.4. Le VIH-1 est dégradé dans les DC

• Le VIH-1 entre majoritairement dans les iDC par le biais de CLR. Une fois reconnu par le récepteur DC-SIGN, le VIH-1 est **rapidement (5-15 min)** internalisé de façon dépendante de la clathrine [138] et les virions restent infectieux même après l'internalisation dans un compartiment à faible pH de type endosome [141,142] (**illustration 12, partie centrale**). Grâce à l'utilisation de la microscopie confocale, il a été décrit que **30 min** après la mise en contact avec les iDC, les virions sont acheminés vers des compartiments types **endosomes tardifs** et des lysosomes (pH 5,47) alors qu'il s'agit plutôt de

compartiments moins acides type endosome précoces (pH 6,45-6) dans les mDC ce qui corrèlerait avec une diminution de la dégradation des virions [117,201]. Ces données sont confirmées par une autre étude montrant, lors d'une expérience de pulse-chase dans des iDC ou mDC, que très rapidement, au cours des 10 premières minutes le VIH-1 est fortement dégradé indépendamment de l'état de maturation des DC (**environ 80% pour les iDC** et 60% pour les mDC) [142]. De manière intéressante, un pré-traitement de 30 minutes avec de la bafilomycine-A à 250 nM final (inhibiteur de l'acidification vésiculaire et des enzymes protéolytiques lysosomales) des MDDC infectées 2H avec le VIH-1 montre une forte inhibition de la dégradation virale (Elisa p24), suggérant ainsi qu'une grande partie des virions internalisés est effectivement dégradée par voie endolysosomale [91]. Enfin, il a été suggéré que l'internalisation par les iDC des complexes DC-SIGN-ligand (gp120, anticorps) dans des organites acides tels que des endosomes tardifs et des lysosomes, pourrait permettre la dissociation ligand-DC-SIGN assurant d'une part le recyclage rapide constaté de DC-SIGN à la surface cellulaire et, d'autre part la dégradation des ligands au vu de la présentation antigénique CMH-II [117,142].

•Les MDDC et des LB transduits pour exprimer le récepteur DC-SIGN sont capables de capturer et de dégrader le VIH-1 et présenter des antigènes dérivés du virus aux LT $CD4^+$ spécifiques du VIH-1 sans que les DC soient elles-mêmes productivement infectées [92]. En mettant en compétition avec des anticorps l'accessibilité des récepteurs CD4 et DC-SIGN, ces mêmes auteurs ont décrits que 50% de la présentation antigénique via les molécules du CMH-II est dépendante du récepteur DC-SIGN. Cette même équipe a décrit qu'une fraction du matériel viral entrant peut aussi être traitée par le protéasome (car diminution si traitement par epoxomycine, inhibiteur du protéasome), ce qui conduit à l'activation de clone de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques anti-VIH-1 par des cellules exprimant DC-SIGN (LB DC-SIGN et MDDC) mais aussi d'autres récepteurs y compris CD4 [91]. DC-SIGN favorise ainsi la capture du VIH-1 entrant et la **présentation croisée d'antigènes via les molécules du CMH-I** mais comme pour la présentation CMH-II, d'autres récepteurs d'entrée virale semblent impliqués.

•Au regard de ces résultats, il semblerait que plusieurs étapes puissent avoir lieu consécutivement, en effet durant la phase initiale de reconnaissance et d'entrée du virus dans les DC (premières heures <24H), le VIH-1 est rapidement et considérablement dégradé par la voie endolysosomale [92,117,141] et, dans une moindre mesure, protéasomale [91,130] limitant ainsi la propagation du virus. De façon très intéressante, il a été décrit que le VIH-1 peut aussi être dégradé par autophagie dans les MDDC et les cDC ($CD1c^+$) dermiques [158]. Cependant, le VIH-1 est capable d'inhiber l'autophagie pour favoriser la transmission de l'infection vers des LT $CD4^+$. Aussi, il a été démontré dans cette étude que l'inhibition de l'autophagie entrave de manière significative les fonctions immunitaires innées et adaptatives (présentation CMH-II) des DC. En effet, l'autophagie joue un rôle important dans la régulation des

réponses immunitaires innées et adaptatives contre les agents pathogènes [202]. Les détails du rôle de l'autophagie dans les DC notamment dans le cadre de l'infection par le VIH-1 sont évoqués dans le chapitre D.12.

•L'entrée du VIH-1 dans les DC peut conduire à l'accumulation d'endosomes tardifs connus sous le nom de corps multi-vesiculaires (MVB) formés par bourgeonnement de la membrane endosomale. Après absorption de l'antigène, les MVB peuvent soit être transportés vers le système lysosomal alimentant la voie de traitement des antigènes, soit être renvoyés vers la surface, où ils participent au recyclage des récepteurs en surface à la membrane plasmique. Nous verrons dans le chapitre suivant que les MVB peuvent aussi être à l'origine du relargage d'exosomes hors de la cellule [203].

6.5. Echappement viral, le VIH-1 détourne les fonctions de la cellule dendritique

6.5.1. La *trans*-infection

•Le récepteur DC-SIGN est un récepteur clé dans l'entrée des pathogènes et notamment du VIH-1 dans les DC, si bien que le virus a développé de nombreux mécanismes pour détourner les fonctions de PRR. Dès la découverte du récepteur DC-SIGN, les auteurs décrits la même année la capacité de ce récepteur à transmettre le VIH-1 aux LT $CD4^+$ par un mécanisme définit comme la ***trans*-infection** [105] (**illustration 12, 3**). Une augmentation de l'infection des LT CD4+ lors de co-cultures avec des DC, préalablement mises en contact avec des virus (X4 ou R5), avait déjà été décrite [204]. La *trans*-infection semble être un mécanisme type-cellulaire dépendant car contrairement à la lignée myélo-monocytaire THP-1 transduite avec le récepteur DC-SIGN, il semble que comme les MDDC, la lignée cellulaire de lymphocyte B transduite Raji-DC-SIGN soit un bon modèle d'étude de la *trans*-infection [205,206].

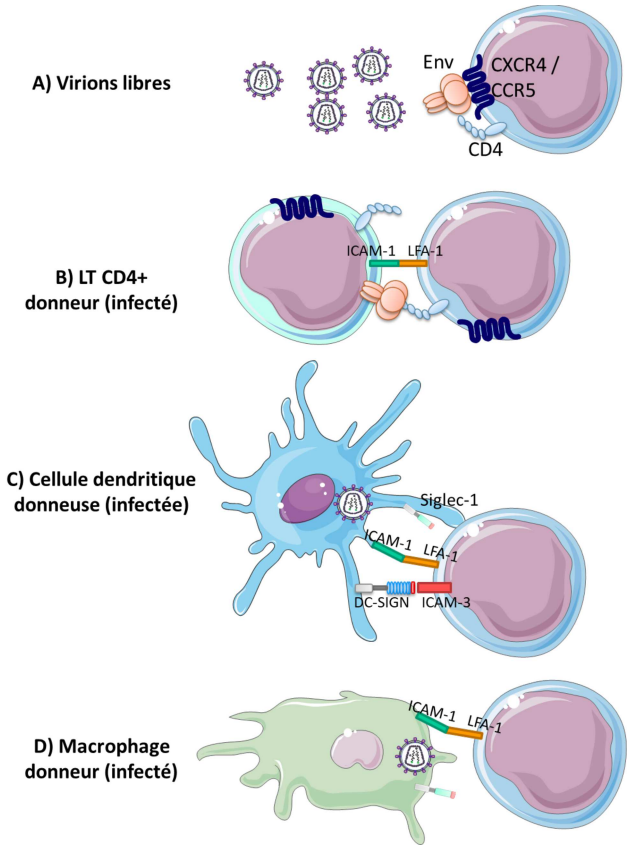
D'autre récepteurs sont capables de promouvoir le transfert du VIH-1 en *trans* :
•Le récepteur **DCIR** semble participer à la *trans*-infection [194] contrairement au récepteur CLR des LC, la langerine (CD207) qui agit comme une barrière naturelle anti-VIH-1 et permet une dégradation efficace du VIH-1 [207].

• Sans déterminer le mécanisme responsable, il a été décrit que les mDC mises en contact avec une forte charge virale pouvait aussi transmettre le virus du VIH-1 aux LT $CD4^+$ de manière plus marquée que les DC immatures [181]. La maturation diminue la quantité de récepteur DC-SIGN exprimée à la surface cellulaire, il a été décrit par la suite que d'autres récepteurs de la famille des lectines étaient capables de permettre l'entrée et la transmission du VIH-1 dans les mDC tels que les récepteurs Siglec [208,209]. Concernant les mDC, le récepteur **Siglec-1** (CD169) est capable de reconnaître des motifs composés d'acide sialique à la surface des virions [83]. Siglec-1 est aussi exprimé par les macrophages

dérivés de monocytes (MDM) ainsi que par les monocytes. Siglec-7 a aussi été décrit comme étant capable de lier la gp120 à partir de différentes souches de VIH-1 avec une affinité inférieure par rapport à Siglec-1, Siglec-7 contribue à l'entrée et à l'infection virales dans les LT CD4+ et les MDM [210].

6.5.2. La synapse virologique

•De façon très intéressante, il a été observé que le VIH-1 polarise dans les DC vers les zones de contact entre les DC et les LT $CD4^+$ [211]. En effet, on retrouve concentrés dans ces zones de contact les récepteurs du VIH (CD4 et corécepteurs), certaines protéines virales telles que l'enveloppe virale (Env), ainsi que certaines protéines préalablement impliquées dans la formation de synapses immunologiques (ICAM1/LFA1). Cette zone de contact cellulaire a été définie comme **une synapse virologique (SV) ou infectieuse** par analogie avec la synapse immunologique [211,212] (**illustration 13**). La formation de la SV est un processus impliquant le cytosquelette dépendant de l'actine et de la tubuline et requérant une adhésion cellule-cellule, qui est facilité par la présence de molécules d'adhésion cellulaire. Par exemple, la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1) et ICAM-2 dans la synapse formée entre cellules T qui se lie à l'antigène 1 associé à la fonction du leucocyte (LFA-1) [213] et ICAM-3 enrichi au site de contact cellulaire [214,215]. La formation de synapse virologique (SV) peut avoir lieu indépendamment de celle de synapse immunologique étant donné qu'il a été décrit que les molécules du CMH-II (DC) et le TCR (LT) n'étaient pas requises pour le transfert viral aux LT $CD4^+$ [216,217]. Ainsi, ce contact à travers la SV favorise le transfert de particules virales stables et infectieuses vers les cellules cibles majoritaires du VIH-1 : les LT $CD4^+$ [188,201]. En revanche si l'entrée du virus n'est pas obligatoirement dépendante du récepteur DC-SIGN [20], le transfert de l'infection en *trans* et la polarisation des particules virales vers la synapse virologique semblent **dépendants de la présence du récepteur DC-SIGN** [188]. En effet, plusieurs études montrent que le récepteur DC-SIGN est particulièrement important pour le transfert viral [141]. Aussi, la protéine virale accessoire Nef peut bloquer l'endocytose du récepteur DC-SIGN, de sorte que le récepteur soit mieux représenté à la surface des DC [218]. L'augmentation de la quantité de récepteurs DC-SIGN à la surface cellulaire augmente les contacts cellulaires, facilite l'entrée virale, la liaison DC-LT lors de la synapse virologique et favorise la transmission du VIH-1 [218]. En outre, la liaison entre l'enveloppe du VIH-1 et DC-SIGN induit l'activation de la RhoGTPase Cdc42 promouvant ainsi la formation d'extensions (protrusions) à la surface des DC, facilitant ainsi les rapprochements et les contacts DC-LT et le passage des virions vers les LT $CD4^+$[133]. Enfin, l'engagement de DC-SIGN peut aussi induire l'activation de LARG générant des réarrangements du cytosquelette qui sont importants pour la formation de la synapse virologique [133,219]. Les résultats de ces études contribuent également à expliquer le rôle crucial de DC-SIGN dans la formation de la synapse virologique.



(A) Virus libre reconnaissant le récepteur CD4 et un corécepteur pour infecter une cellule T CD4+. Synapse virologique entre un
(B) LT CD4+ infecté vers un LT CD4+ non infecté,
(C) entre une cellule dendritique et un LT CD4+,
(D) entre un macrophage et un LT CD4+.

Inspiré de : Law K. et al., Cell-to-Cell Spread of HIV and Viral Pathogenesis, Advances in Virus Research, 2016.

Illustration 13 - Transmission virale de virus libres ou entre cellules

Par ailleurs, les DC ne doivent pas nécessairement être productivement infectées pour la *trans*-infection qui est un processus indépendant de la réplication virale [105,183]. En outre, la transmission d'infection via les contacts cellule-cellule a été montré comme étant 100 à 18 000 fois plus efficace que l'infection par le virus libre en contact direct avec les LT CD4$^+$ [220,221] (**illustration 13**). Ce mode de transmission a été suggéré comme étant protecteur pour le virus vis-à-vis de certains mécanismes de défenses immunitaires tels que les anticorps neutralisants ou même envers les thérapies antivirales [212,222]. Le VIH-1 peut ainsi tirer profit des capacités immunitaires et migratoires des DC pour se rapprocher de ses cibles principales les LT CD4$^+$. En effet, les DC vont migrer des sites d'entrée périphériques (peau, muqueuse, site de l'inflammation) vers des zones enrichies en LT tels que les ganglions lymphatiques dans le cadre de l'initiation des réponses immunes adaptatives. Le VIH-1 va donc utiliser cette proximité pour infecter de nouvelles cellules cibles afin de garantir sa propagation et la progression de l'infection.

•LT CD4$^+$ infectés vers LT CD4$^+$ non infectés : Le VIH-1 utilise particulièrement le contact cellulaire entre LT CD4$^+$ pour se propager et induire une déplétion progressive de cette population de cellules immunitaires et créant un état d'immunodépression [11]. La formation de ces contacts cellules-cellules

(**illustration 13**) se fait par reconnaissance entre l'enveloppe virale (exprimée à la surface des cellules infectées) et CD4 à la surface des cellules cibles (non infectées) induisant la fusion cellulaire : on parle alors de syncytia. Le contact Env-CD4 aboutit à la mort cellulaire par apoptose dépendante de l'autophagie des cellules T non infectées [12]. La transmission du VIH-1 via les synapses virologiques créées entre LT $CD4^+$ infectés et LT $CD4^+$ non infectés a aussi été montrée comme essentielle pour une mort cellulaire des LT $CD4^+$ avoisinants par pyroptose [11].

•**Des macrophages vers les LT $CD4^+$** : Très récemment, il a été observé par microscopie *in vivo* (microscopie intravitale) chez la souris que le VIH-1 pouvait aussi utiliser les macrophages pour être transmis par *trans*-infection aux LT $CD4^+$ [223] (**illustration 13**). Cette fois, la *trans*-infection semble fortement impliquer le récepteur Siglec-1 [208]. Par ailleurs, dans les macrophages n'exprimant pas DC-SIGN, le récepteur de mannose des macrophages (MR) est un récepteur alternatif qui permet la *trans*-infection vers les cellules T [192].

6.5.3. L'exocytose de particules virales

Le transfert du VIH-1 des iDC vers les lymphocytes T $CD4^+$ peut dépendre de plusieurs mécanismes comme la SV ou encore de l'exocytose de particules virales [203] (**illustration 12, 4**). En effet, très rapidement après sa capture, le virus peut être internalisé dans un endosome ou dans un corps multi-vésiculaires (MVB) exprimant les marqueurs suivants HLA-DR1, CD1b, CD9 et CD63. Les protéines d'activation et d'adhésion présentes dans les exosomes dérivés de DC pourraient jouer un rôle indirect, soit en améliorant l'adhésion de la particule virale à la surface de la cellule T cible, soit par l'activation de cellules T. Ensuite le VIH-1 peut être libéré en association avec des exosomes pour infecter les cellules T $CD4^+$ avoisinantes sans contact cellulaire direct. Il est important de noter que les particules de VIH-1 associées aux vésicules d'exocytose semblent moins infectieuses que les particules virales transmises par la VS, suggérant ce relargage comme étant indépendant de la réplication virale [203]. Les mDC peuvent aussi participer à la dissémination du VIH-1 par exocytose à partir de MVB $CD81^+$ et indépendamment de la liaison gp120-CLR [201,224].

6.5.4. Un compartiment viral protégeant le VIH-1 dans les mDC

Les iDC internalisent et dégradent efficacement le VIH-1 afin de présenter des antigènes aux LT, la *trans*-infection semble ainsi être une conséquence du surplus de virus résiduel à l'intérieur ou bien à la surface de la cellule. Par contre, les mDC qui ont des capacités diminuées pour l'endocytose et la dégradation des virus, vont présenter la formation d'un compartiment intracellulaire dans lequel les virions infectieux ne sont pas éliminés mais demeurent protégés [201]. Ce stock viral infectieux peut rester protégé ainsi pendant plusieurs jours puis être transmis aux LT $CD4^+$ [206,225]. En effet, quelques heures après l'entrée du VIH-1 (8H minimum), il a été observé uniquement dans les MDDC mature

(LPS) que les virus pouvaient demeurer stables, entiers et infectieux dans des **compartiments** non lysosomaux (pas de marqueurs tels que CD63, LAMP-1), à pH faible (pH 6,1-6,2) et non dégradatifs et riches en tétraspanines (CD9, CD63, CD81, and CD82) [201,225,226] (**illustration 12, 5**). Les tétraspanines facilitent l'agrégation des protéines dans les micro-domaines membranaires et exercent plusieurs fonctions dans la fusion cellule-cellule, l'adhésion cellulaire, la motilité cellulaire et la formation de complexes de synapse immunologique. La formation de ce compartiment contenant du virus (aussi appelé VCC pour Viral containing compartment) [227] semble étroitement liée à l'activation et à la **maturation** des DC, les iDC ont des compartiments plus petits et observés après 16-24h de challenge viral [225]. À l'heure actuelle, les mécanismes sous-jacents de la formation de ce compartiment sont toujours méconnus. On ne sait pas si ce compartiment est le fruit du détournement viral du trafic intracellulaire et des voies de dégradation ou si c'est un moyen pour la mDC d'essayer de protéger les cellules avoisinantes en maintenant ces virions indisponibles. Quoi qu'il en soit, la conséquence est que le VIH-1 va pouvoir exploiter cette situation afin d'être transmis aux cellules T $CD4^+$ notamment par exocytose, par *trans*-infection, *cis*-infection et par le biais de la SV [226]. Néanmoins, une autre étude décrit que seuls les virions liés à la surface des DC (compartiments très proches de la membrane) et des virions non intériorisés seraient transmis aux cellules T [228]. Dans les macrophages des structures similaires ont été observées [229,230].

7. DEFENSES ANTIVIRALES DE L'HOTE

Les cellules dendritiques sont des cellules ayant pour rôle la détection et l'élimination des pathogènes, c'est pourquoi, comme détaillé précédemment (chapitre B.5.2), elles expriment des récepteurs membranaires et cytoplasmiques, les **PRR**, pouvant reconnaître différents motifs conservés (PAMP) des pathogènes. Lors de l'infection par le VIH-1, de nombreux acteurs cytoplasmiques cellulaires, les **senseurs**, jouent un rôle important pour la détection de l'infection et l'initiation de la réponse immune. Et enfin, d'autres facteurs peuvent bloquer ou interférer avec la réplication du virus : les **facteurs de restriction virale (FRV)**. Néanmoins, malgré les nombreux acteurs cellulaires mis en place pour restreindre la progression virale, les virus évoluent en même temps que l'hôte et ont développé des mécanismes d'échappement leur permettant de contrer les défenses cellulaires, mais aussi de persister à long-terme chez l'hôte (**tableau 6**).

Etape du cycle viral	Nom	Senseur / facteur de restriction (FRV)	Inductible par l'IFN	Type cellulaire	Ligand	Rôle /fonction	Echappement viral
Décapsidation	CypA	Senseur	Oui (IRF3)	MDDC / cDC	Capside virale	Détecte la capside virale et induit de l'IFN de type I	CypA peut aussi protéger la capside virale de la dégradation
	Trim5 alpha	FRV	oui	LT CD4+ / macrophages / LC /DC		Trim5α primate non humain et humain (LC) PRR et décapsidation précoce	Mutation de la capside virale
Rétro-transcription (cytoplasme)	SAMHD1	FRV	Non	Macrophages / MDDC / cDC / pDC	dNTPs	Déplète le pool cytoplasmique disponible de dNTPs / dégradation de l'ARN viral	Vpx (VIH-2 ou SIV) entraine la dégradation de SAMHD1
Réplication	APOBEC3 -G-F-D-H	FRV	Oui IFN type I dans les MDDC/pDC	Macrophages / LT CD4+ / MDDC / cDC / pDC	ADN db (brin anti-sens)	Induit des hypermutation dans le génome viral	Vif entraine la dégradation d'APOBEC
	cGAS	Senseur	Oui STING/IRF3	MDDC / Macrophages / THP-1	ADN proviral / ADNc	Détecte l'ADN viral produit après la rétro-transcription	La compétition avec TREX1 peut minimiser l'action de cGAS
	IFI16			LT CD4+ / macrophages			Induit la mort par pyroptose des LT CD4+
	TREX1		Non	Macrophages			Dégrade les ADN défectifs favorisant l'insertion ADN fonctionnels dans le génome cellulaire
Bourgeonnement	Tétherine (BST2)	FRV	Oui IFN type I dans les MDDC	Nombreuse cellules / MDDC/ LT CD4+	Virion	Bloque la sortie du virion à la membrane plasmique	Vpu et Env lient BST2 et entrainent sa dégradation lysosomale

Tableau 6- Les senseurs et facteurs de restriction viraux

7.1. Les réponses immunitaires innées anti-VIH-1

Les défenses antivirales innées sont cruciales pour détecter et stopper l'infection et la dissémination du VIH-1 dans les cellules. Les DC possèdent un rôle très important dans l'initiation des réponses immunitaires innées, mais l'infection par le VIH-1 semble influer sur les fonctions des DC et leurs réactivités.

7.1.1. Les récepteurs cellulaires (PRR) reconnaissant la présence du VIH-1

De nombreux récepteurs cellulaires sont capables de détecter la présence de l'infection par le VIH-1 et d'initier une réponse immune en conséquence. La diversité des PRR exprimés par les DC est détaillée dans le chapitre B.5.2. Nous verrons dans ce chapitre que pour chaque étape du cycle viral, l'hôte a développé des senseurs capables de reconnaître des constituants viraux.

7.1.1.1. Les TLR

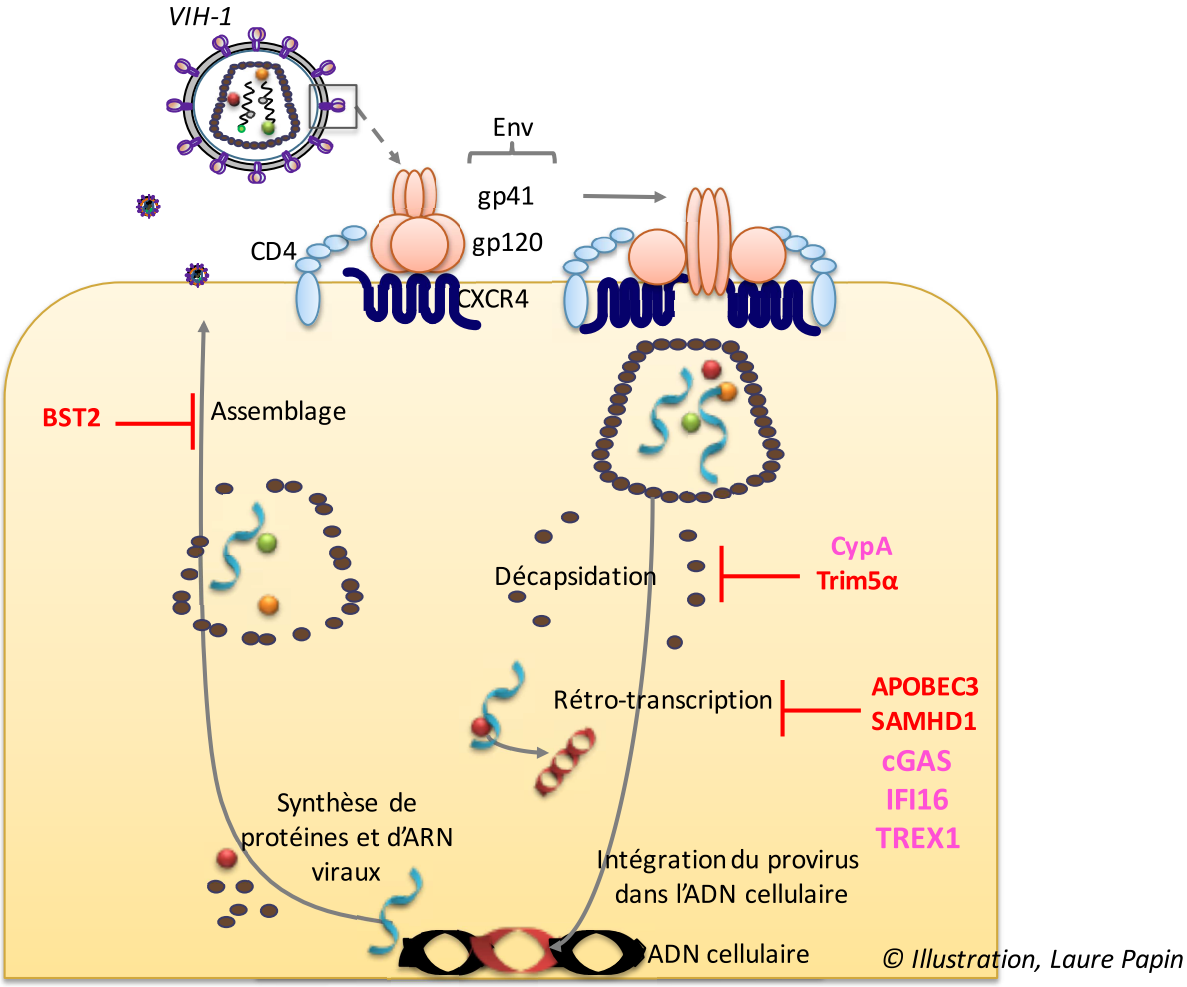
Chez les MDDC le VIH-1 est capable d'exploiter la cascade de signalisation conjointe des récepteurs DC-SIGN et **TLR-8** de façon à augmenter la réplication du provirus intégré dans le génome cellulaire par la transcription de gènes viraux nécessaires pour la réplication virale Tat, Rev et Vpu [128]. L'engagement de DC-SIGN par le VIH-1 peut induire une surexpression d'IL-10 (toutefois seulement après que **TLR-4** soit ciblé par du LPS), générant un environnement propice pour la propagation du virus [125]. Enfin, une étude très récente montre que cibler les **TLR-3 et -4** avec des ligands adéquats chimériques permet de diminuer la réplication virale dans les DC et augmente la capacité d'activation des LT par des DC infectées par le VIH-1 [231]. Le récepteur **TLR-7,** fortement exprimé dans les endosomes des pDC, joue un rôle très important dans la détection de l'ARN viral (simple brin) du VIH-1. En effet, la signalisation issue de la reconnaissance de cet ARN engendre une forte production d'interféron (IFN) de type I et de cytokines pro-inflammatoires [232]. L'induction de la réponse immunitaire innée par les agents pathogènes viraux se caractérise généralement par la production rapide d'IFN de type-I (IFN alpha / beta) qui jouent un rôle majeur dans l'inhibition de la réplication des virus. Concernant les MDDC, elles expriment **TLR-8** qui peut, en principe, reconnaître l'ARN viral. Cependant, les MDDC ne s'activent pas et ne produisent pas ou très peu d'IFN de type I en réponse aux particules virales VIH-1 [68]. En revanche, la reconnaissance de l'ARN viral par le **TLR-8** peut induire l'activation et la maturation des MDDC [233]. Enfin, l'infection des MDDC par le VIH-1 semble affecter leurs capacités de réponses immunes, bloquer la production d'IFN de type I (même si elle est faible) et la maturation par un mécanisme encore inconnu [234,235]. L'exposition des pDC à la gp120 du VIH-1 semble inhiber les réponses **TLR-9** (mais pas TLR-7), y compris l'activation des pDC et la sécrétion d'IFN de type I (alpha) [236].

7.1.1.2. RIG-I

Le récepteur cytosolique **RIG-I** reconnaît aussi l'ARN monocaténaire de nombreux virus et aussi les formes nucléiques mono et dimériques du VIH-1 conduisant à une activation de la signalisation dépendante de RIG-I. Cependant il a été monté que dans les PBMC (cellules mononucléées du sang périphérique) et les macrophages, le VIH-1 a développé un mécanisme d'évasion dans lequel la protéase virale est utilisée pour épuiser le récepteur RIG-I du cytoplasme, inhibant ainsi l'initiation de la cascade de signalisation RIG-I qui pouvait générer de faible quantité d'IFN de type I [237,238].

7.1.2. Les senseurs cytoplasmiques et facteurs de restriction antiviraux

La détection du VIH-1 par les DC et la signalisation générée par les PRR entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires et d'interféron (pDC). Les protéines issues de gènes stimulés par l'interféron (**ISG**) effectuent un large éventail de fonctions effectrices antivirales [239]. Ces **senseurs** et protéines cellulaires issues d'ISG permettent de lutter contre la propagation du virus et peuvent aussi permettre de recruter les cellules immunitaires nécessaires pour l'établissement des défenses antivirales innées (**illustration 14**).



Les facteurs de restriction, en rouge.
Les senseurs reconnaissant des motifs viraux, en rose.

Illustration 14- Senseurs cytosoliques du VIH

Certaines des protéines cellulaires, la plupart du temps issues d'ISG, sont appelées **facteurs de restriction (virale)** (FRV) car ils exercent une action antivirale puissante permettant de bloquer une étape du cycle viral. Il n'existe pas de définition universelle de ces FRV car ils n'ont pas d'éléments structuraux, de mécanismes, ni de cibles communes. En revanche, ils partagent tous la même fonction antivirale et ces facteurs de l'immunité innée sont exprimés de manière constitutive et/ou sont inductibles par l'interféron. Le VIH-1 est massivement dégradé dans les DC mais le virus est aussi capable d'échapper à sa dégradation afin d'être transmis aux LT $CD4^+$. En outre, les DC sont très réfractaires à l'infection productive par le VIH-1, il est possible d'expliquer cela du fait qu'elles expriment de nombreux FRV bloquant la réplication virale. Néanmoins, ces facteurs sont souvent la cible de protéines virales dites « accessoires » du VIH de type 1 ou 2 ou encore du SIV pouvant contrer leurs actions antivirales. Cela est encore un exemple montrant que les pathogènes comme le VIH-1 évoluent dans un environnement hôte/pathogène pour enrayer ou limiter la réponse immunitaire de l'hôte leur permettant ainsi de se propager. Le **tableau 6** résume les différents FRV, l'étape du cycle viral sur laquelle ils agissent, leur rôle ainsi que l'échappement viral.

7.1.2.1. Durant la décapsidation

•Un des FRV agissant très rapidement après l'entrée du VIH-1 dans les cellules est **TRIM5α** (protéine 5 contenant un motif tripartite). Jusqu'à présent, seuls les TRIM5α de primates non humains (Simien : singe vert d'Afrique et macaque) ont été décrites comme étant capables de reconnaitre la capside virale du VIH-1 et d'autres rétrovirus agissant ainsi comme des FRV inter-espèce [240,241]. En effet, dans les lignées cellulaires utilisées le TRIM5α humain ne reconnaît pas ou peu la capside du VIH-1 et par conséquent induit une faible restriction de l'infection [242]. Récemment, le groupe du Docteur Teunis B. H. Geijtenbeeck a montré que le TRIM5α humain pouvait exercer un effet antiviral dans les cellules de Langerhans (langerine $CD207^+$), mais pas dans les sous type dermiques de DC DC-$SIGN^+$ [131]. De plus, cette étude suggère que le récepteur d'entrée du VIH-1, langerine pourrait spécifiquement acheminer le VIH-1 vers TRIM5 induisant la dégradation du VIH-1 par autophagie. Concrètement, le domaine C-terminal SPRY du TRIM5α Rhésus (RhTRIM5α) se lie à la capside du VIH-1 [243]. Dans un premier temps, la reconnaissance directe de la capside de rétrovirus comme le VIH-1 peut agir comme un PRR en interagissant avec des facteurs favorisant les réponses inflammatoires et promouvant ainsi les réponses immunes innées antivirales [244]. Dans un deuxième temps, la reconnaissance de la capside virale va aussi induire la décapsidation prématurée du core viral et empêcher la protection du génome viral l'exposant à la vue de senseurs et FRV capables de le reconnaître [243] (**illustration 14**). Concernant les mécanismes de dégradation impliqués, l'activité ubiquitine ligase de RhTRIM5α (exercée par son domaine RING) semble nécessaire pour la décapsidation virale [245,246] suggérant que RhTRIM5α pourrait

utiliser le protéasome pour la dégradation du VIH-1 [247,248]. D'autre part, il a été décrit que TRIM5α pouvait induire la dégradation du VIH-1 par une forme très sélective d'autophagie [249] bien que cette dégradation ne semble pas être requise pour la restriction antivirale [250]. Ce mécanisme de dégradation autophagique sera décrit dans le chapitre D.10.4. Pour finir, jusqu'à présent aucune protéine accessoire virale n'a été décrite comme étant capable de contrer ce FRV, cela peut s'expliquer par le fait que le TRIM5α humain est majoritairement décrit comme inefficace chez l'Homme. Néanmoins, la mise en contact d'un variant surexprimé de TRIM5α humain dans des cellules infectées peut engendrer l'adaptation du VIH-1 par l'apparition de mutation sur sa capside virale [251]. Aussi, l'interaction capside virale – TRIM5 humain semble pouvoir être améliorée par la mutation d'un seul acide aminé dans la séquence SPRY du FRV [252].

Un nombre croissant d'études rapportent que des protéines de la famille des TRIM exercent une activité antivirale impliquée dans l'immunité innée. Nous avons cité précédemment (chapitre B.5.2.3 et C 7.1.1.2) l'implication de **TRIM25** et son activité E3 ligase dans l'activation du récepteur RIG-I impliqué dans la réponse antivirale (production d'IFN). Une autre protéine de la famille TRIM ayant montré une forte implication dans les défenses immunitaires innées est **TRIM19/PML** (promyelocytic leukemia protein) qui peut interférer dans le cycle réplicatif de nombreux virus à ADN ou à ARN comme le VIH-1 [253]. Enfin, récemment certaines protéines de la famille TRIM ont été montrées comme essentielles pour une nouvelle forme de dégradation sélective par autophagie, l'autophagie de précision [254]. Cette forme spécifique d'autophagie sera décrite dans le chapitre D.10.4.

•Un autre senseur capable de reconnaître la capside virale est la **cyclophiline A** (CypA) [255] (**illustration 14**). La CypA est exprimée de façon ubiquitaire dans la plupart des cellules et possède plusieurs rôles connus qui s'opposent [256]. En effet concernant le VIH-1, lors de l'entrée virale, CypA peut se lier directement à la surface de la capside du VIH-1, différents rôles ont été attribués à cette liaison CypA – capside (site de liaison sur la protéine CA p24) en fonction du type cellulaire [256]. D'une part, la protéine CypA peut jouer un rôle protecteur de la capside virale, favorisant ainsi le virus en la protégeant d'autres facteurs cellulaires pouvant la dégrader [257]. De façon contradictoire, d'autre part que lorsque l'on force l'infection des MDDC en transduisant la protéine virale Vpx (SIV) (voir ci-après pour l'explication du mécanisme) la CypA peut détecter la capside virale nouvellement synthétisée et induire une forte production d'interféron de type I, diminuer la *trans*-infection des LT CD4+ et induire l'expression des molécules de co-stimulation [258].

7.1.2.2. Durant la réplication virale

• **SAMHD1** (protéine 1 contenant un domaine SAM motif stérile alpha et HD domaine acide aspartique) a été identifié comme facteur capable de fortement restreindre la réplication [259,260]. SAMHD1 est particulièrement exprimée dans les cellules myéloïdes telles que les macrophages ou les DC ainsi que

dans les LT CD4+ quiescents, représentant un réservoir viral potentiel. Deux rôles majeurs de SAMHD1 ont été identifiés, le premier est indirect et considère sa capacité à épuiser les ressources disponibles en dinucléotide triphosphate (dNTP) intracellulaires et le second à dégrader l'ARN viral [259–261]. D'une part, SAMHD1 étant une phosphohydrolase, cette enzyme peut hydrolyser les dinucléotides triphosphates (dNTP) disponibles en dinucléoside (+phosphate) dans le cytoplasme cellulaire privant ainsi la RT virale de son substrat pour effectuer la transcription inverse du génome viral [260,262] (**illustration 14**). D'autre part, SAMHD1 a aussi été rapporté comme étant une nucléase capable de cibler l'ARN génomique viral pour induire sa dégradation [261]. Enfin, de façon très intéressante, il a été décrit que la protéine accessoire Vpx exprimé par le VIH-2 et certains SIV pouvait entrainer la dégradation de SAMHD1 [259,260]. En effet, Vpx induit l'ubiquitination puis la dégradation par le protéasome de SAMHD1 ubiquitinylé grâce au recrutement d'un complexe E3 ubiquitine ligase contenant CUL4A, une protéine de liaison à l'ADN (DDB1) et le facteur DCAF1 [263,264]. Il est possible d'expliquer le fait que les DC soient très réfractaires à l'infection productive par le VIH-1, par l'absence d'expression de la protéine accessoire Vpx. Par conséquent, bloquer SAMHD1 en incorporant (transduction) la protéine Vpx dans les DC permet d'augmenter significativement l'infection des DC par le VIH-1 [259,260]. Enfin, l'équipe du Docteur Geijtenbeek a décrit que supprimer l'expression de la protéine SAMHD1 induisait une augmentation de la réplication virale du VIH-1 dans les DC n'induisait pas une meilleure maturation des DC. Cela signifie que le VIH-1 échappe au système immunitaire des DC par un mécanisme indépendant de SAMHD1 [179].

•Les protéines de la famille **APOBEC3** (A3) (« apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3 ») sont des cytidines déaminases cytoplasmiques capables de reconnaître l'ADN viral et d'y introduire des mutations ponctuelles [265] (**illustration 14**). En effet, le FRV A3G induit préférentiellement des hypermutations GG en AG alors que toutes les autres APOBEC3 induisent préférentiellement des hypermutations GA en AA. L'introduction de ces mutations conduit souvent à l'introduction de codons STOP et induisant la synthèse de génomes viraux défectueux pour la réplication [266]. Il existe sept enzymes A3 humaines (A, C, D, E, F, G, H), elles sont exprimées par de nombreux types cellulaires comme les cellules immunitaires (LT, LB, phagocytes), mais aussi par de nombreuses lignées cellulaires [267]. Seules les enzymes A3D, A3F, A3G et A3H semblent restreindre la réplication du VIH-1 dans les LT $CD4^+$. Concernant les DC, il a été décrit que les protéines A3G, A3F, and A3A sont induites par l'interféron de type I (alpha) dans les MDDC immatures, permettant ainsi de renforcer la restriction virale et de restreindre la *trans*-infection [268,269]. Les A3, tel que A3G, possèdent un rôle prépondérant de FRV en étant encapsulés dans les virions et en restant associés aux RTC viraux. Cela permet à A3G d'interférer avec la synthèse de l'ADNc viral durant la transcription inverse du VIH-1 en introduisant des mutations dans les nouvelles cellules infectées [270]. Par ailleurs, la maturation des MDDC induit une augmentation d'expression de A3G ce qui pourrait aussi expliquer la diminution de

RT et réplication virale dans les cellules matures [268].

Cependant, les protéines A3 ne peuvent effectuer leur fonction de FRV uniquement en l'absence de la protéine virale accessoire Vif [271]. La protéine Vif est capable de reconnaître les FRV A3D, A3F, A3G, et A3H [272]. En effet, la protéine Vif peut induire la dégradation du FRV A3G par le protéasome [273,274].

•Les senseurs cytoplasmiques **cGAS** (cyclique GMP-AMP (cGAMP) synthase) et **IFI16** (inductible à IFNγ 16) reconnaissent le produit de la rétro-transcription virale le brin complémentaire de l'ADN (ADNc) proviral (**illustration 14**). **cGAS** a été montré comme étant capable de détecter l'ADNc du VIH-1 et -2 dans les MDDC, les macrophages et les THP-1 (lignée cellulaire myelomonocytaire) infectées [275,276]. Cette détection par cGAS induit une production de cGAMP qui se lie et active la protéine d'adaptateur STING (gène stimulateur induisant ainsi la production d'interféron de type I et d'autres cytokines pro-inflammatoires [275]. Par ailleurs, **IFI16** est un senseur pour différentes formes d'ADN produites durant le cycle de réplication viral et diminue la réplication du VIH-1 dans les macrophages [277]. Si dans les macrophages la protéine IFI16 semble jouer un rôle en faveur de l'hôte, il semble que concernant les LT $CD4^+$, ce senseur favorise l'installation de l'immunodéficience. Nous avons évoqué précédemment (chapitre A.1.4) que lors de la primo-infection une grande partie des LT $CD4^+$ quiescents non infectés mourraient par pyroptose [10]. Justement, la détection de l'ADNc par la protéine IFI16 peut induire la production d'IFN par la voie STING/IRF3 mais aussi induire la mort par pyroptose (caspase 1) des LT $CD4^+$ ayant présenté une réplication virale abortive [10,278].

De façon opposé à l'action de cGAS dans les MDDC, ou IFI16 dans les macrophages, une exonucléase **TREX1** (exonucléase 1 de réparation hôte 3) est aussi capable de reconnaître l'excès d'ADNc produit ou la production d'ADN défectifs lors de la transcription inverse du VIH-1 mais cette fois pour induire leur dégradation dans les macrophages [279,280]. Cela aura pour conséquence de favoriser l'insertion d'ADN proviral fonctionnel dans le génome cellulaire. Ainsi, il semble que TREX1 entre en compétition pour la reconnaissance de l'ADN viral en masquant les effets en faveur de l'hôte des protéines cGAS et IFI16 [239].

7.1.2.3. Durant le bourgeonnement

Enfin, une des dernières lignes de défense cellulaire avant la libération des virions néosynthétisés est la protéine tetherin ou BST2 (Antigène 2 stromal de moelle osseuse). Comme les autres FRV, BST2 est constitutivement exprimée et peut être induit par l'interféron de type I (alpha) notamment dans les cDC ($CD1c^+$) et les MDDC [281]. Contrairement aux autres FRV cytoplasmiques, BST2 est une protéine transmembranaire capable de piéger les virions de nombreux virus enveloppés comme le VIH de type 1 et 2 à la membrane plasmique de la cellule infectée [282–284]. La rétention des particules en cours de bourgeonnement peut avoir lieu grâce à la topologie atypique de la protéine transmembranaire BST2 qui est composée d'un extrémité glycolipidique lui permettant de former un pont entre la membrane

plasmique et l'enveloppe du virus naissant [285] (**illustration 14**).

Enfin, comme pour la plupart des FRV décrits précédemment, le VIH-1 a évolué pour contrer l'action de BST2 grâce la protéine virale accessoire, Vpu [283]. En effet, des virions mutants ΔVpu (délétion du géne codant pour la protéine Vpu) ont été retrouvés accumulés près de la membrane plasmique et dans des vésicules de type endosomes (clathrine$^+$ CD63$^+$) suggérant qu'une protéine associée à la surface cellulaire pouvait retenir les virions et aussi diminuer l'entrée de nouveau virus par endocytose [286]. Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer comment Vpu peut induire la diminution de BST2 à la surface membranaire et ainsi favoriser la libération des virions. Vpu pourrait cibler BST2 pour la dégradation protéasomique et/ou lysosomale, grâce à un mécanisme dépendant de la β-TrCP (substrat pour complexe E3 ligases) [287]. Vpu pourrait induire un défaut de routage de BST2 dans des vésicules à clathrine [288]. Enfin, très récemment, il a été décrit que certaines protéines autophagiques notamment LC3C, Beclin-1 et Atg5 favorisent l'action antagoniste de Vpu grâce à un mécanisme d'autophagie non canonique [289]. Par ailleurs, en plus de la rétention physique des particules, la liaison entre des protéines virales et la protéine BST2 (domaine N-terminal) va permettre d'induire une cascade de signalisation aboutissant à l'activation du facteur de transcription NF-κB initiant ainsi des réponses immunes antivirales [286,290].

7.2. Les réponses immunitaires adaptatives des DC anti-VIH-1

Les réponses immunitaires adaptatives sont essentielles pour l'élimination des cellules infectées par le VIH-1 et la protection à long terme. Lors de l'interaction du VIH-1 avec des PRR comme DC-SIGN, le virus internalisé pourra se retrouver dans les voies lysosomales classiques, autophagiques et protéasomales, où les antigènes viraux sont dégradés et présentés via des molécules CMH de classe II aux cellules T CD4$^+$ ou de classe I aux cellules T CD8$^+$ [92,117,141] (**illustration 12, partie gauche**). Dans le cadre d'une infection non productive, ou les DC auront été mises en contact avec une charge virale, le récepteur DC-SIGN internalise le virus puis des complexes DC-SIGN-ligand sont rapidement acheminés vers la voie endo/lysosomale [117,141]. L'internalisation du VIH-1 par les DC via DC-SIGN peut ainsi entrainer une présentation antigénique par les molécules du CMH-II [117] et une activation efficace vers des LT CD4$^+$ spécifiques [92]. Plus tard, la même équipe a montré que DC-SIGN pouvait aussi promouvoir la présentation croisée CMH-I dépendante d'antigènes exogènes issus de la dégradation protéasomale du VIH-1 [91]. Cette présentation croisée aboutira à l'activation de clones LT CD8$^+$ cytotoxiques participant ainsi à la clairance des cellules infectées par le VIH-1. Par ailleurs, bien que SAMHD1 semble fortement protéger les DC de l'infection par le VIH-1, il a été démontré que sa présence (transduction Vpx +/- souche pseudotypées VSG-G) diminuait la présentation antigénique de classe I et II ainsi que la destruction des DC infectées par les LT CD8+ cytotoxiques [291]. Enfin, la dégradation autophagique semble aussi jouer un rôle important dans l'apport d'antigènes viraux pour la présentation antigénique exogène [158]. En revanche, les DC infectées semblent pouvoir présenter des antigènes nouvellement

synthétisés (appelés antigènes endogènes) aux cellules T $CD4^+$ spécifiques mais par un mécanisme indépendant de l'autophagie [159].

CHAPITRE D : L'AUTOPHAGIE ANTI-INFECTIEUSE

8. LA DECOUVERTE ET LA DESCRIPTION DU MECANISME DE L'AUTOPHAGIE

Le terme autophagie provenant des racines grecques « *-auto* » et « *-phagos* » signifiant se manger soi-même a été créé il y a plus de 50 ans par le Docteur Christian De Duve (1963) afin de décrire un processus de dégradation lysosomale de certains organelles intracellulaires (mitochondries, réticulum…) dépendant d'une fusion avec des vésicules nommées alors « autophagosomes ». Très récemment le prix Nobel de médecine et de physiologie (2016) a été décerné au Docteur Yoshinori Ohsumi pour ses travaux décrivant le mécanisme de l'autophagie au niveau génétique et moléculaire. En effet, durant les années 1990, le Docteur Ohsumi et son équipe ont identifié chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) une grande partie des gènes responsables de l'autophagie les *atg* (AuTophaGy related genes) [292–294]. L'autophagie est un mécanisme cellulaire ubiquitaire et constitutif très conservé chez les Eucaryotes. Tout comme le système ubiquitine/protéasome (UPS) ou les mécanismes liés au trafic endosomal et lysosomal (phagocytose, pinocytose, endocytose), l'autophagie est aussi une des voies catalytiques cellulaires centrale parfois essentielle pour le maintien de l'homéostasie cellulaire (**illustration 15**) [295]. En effet, l'autophagie intervient dans la dégradation et le recyclage de constituants cellulaires tels que des protéines mal repliées et/ou agrégées (agréphagie) mais aussi des organelles comme par exemple les mitochondries (mitophagie) et les péroxysomes (péxophagie) dont les constituants pourront être réutilisés pour alimenter le métabolisme cellulaire [296,297]. En opposition au système UPS connu pour la dégradation protéique de protéines à courte durée de vie, l'autophagie intervient plutôt dans la dégradation de protéines à durée de vie longue [152]. D'autre part, l'autophagie est aussi reconnue comme un mécanisme jouant un rôle important dans la survie cellulaire notamment lors d'un stress (par exemple la carence nutritive, des disfonctionnements ou dégénérescence cellulaires ou encore l'hypoxie) [298]. L'autophagie peut aussi être impliquée dans le développement cellulaire et en tant que mécanisme régulateur de mort cellulaire, notamment de la mort cellulaire programmée de type II (PCD de type II) [299]. Enfin, l'autophagie est de plus en plus reconnue comme un élément central dans la réponse inflammatoire et immunitaire innée et adaptative de l'hôte contre les agents pathogènes intracellulaires (bactéries, parasites et virus) [202]. Les organelles liées à l'autophagie, sont capables de séquestrer certains agents ou constituants de pathogènes limitant ainsi leur propagation. Nous verrons par la suite que ce mécanisme rassemblant un ensemble de voies cataboliques peut s'avérer sélectif et spécialisé et aboutir à une dégradation lysosomale.

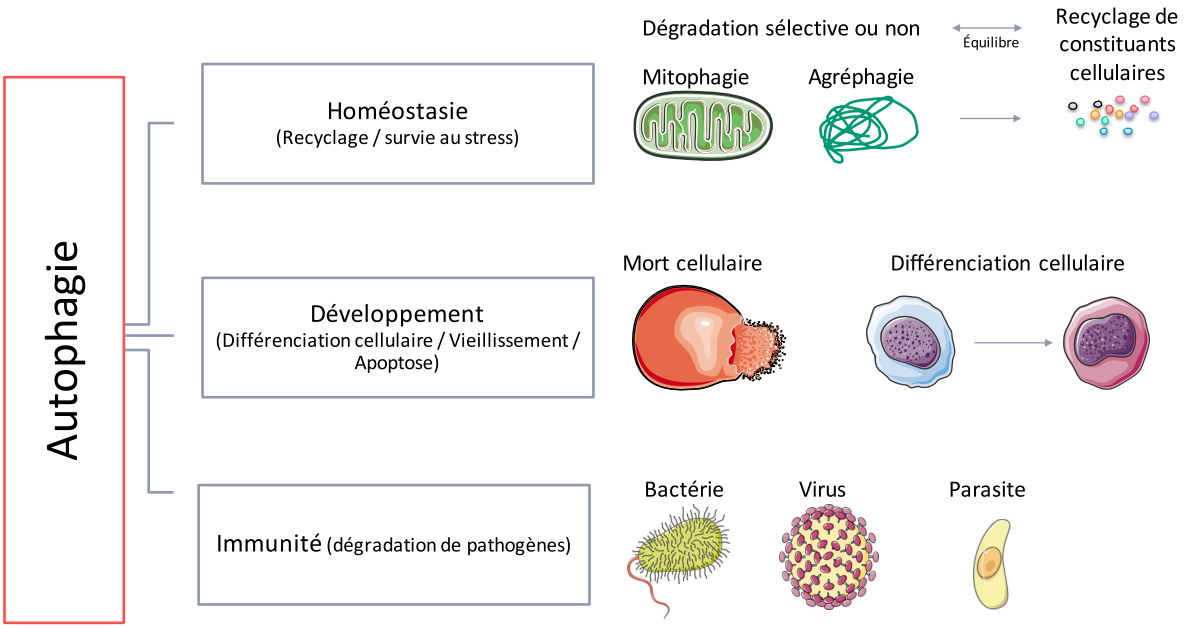
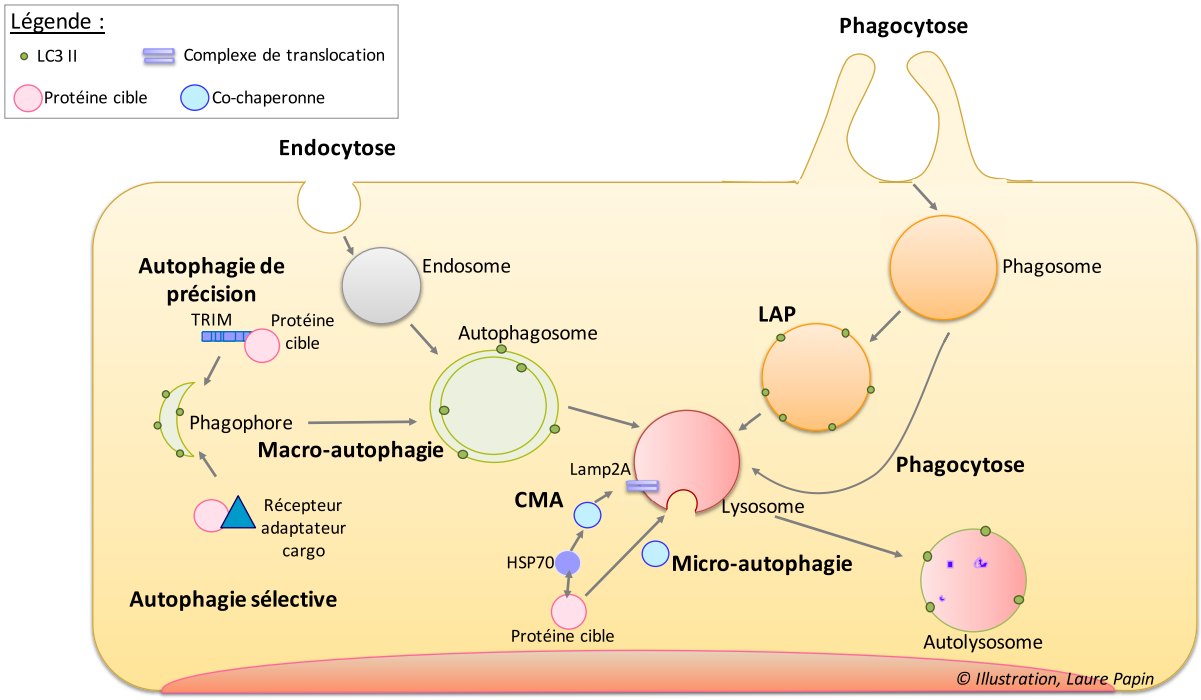


Illustration 15 - Les différents rôles de l'autophagie

9. Les differents sous-types d'autophagie

Il existe trois grands types d'autophagie aboutissant à une même fonction, la dégradation du matériel pris en charge: la macro-autophagie, la micro-autophagie et l'autophagie médiée par des chaperonnes (CMA) [300]. La macro-autophagie (appelée par la suite autophagie) (**illustration 16**) consiste en la formation de pré-structures membranaires (phagophores) dépendantes de deux systèmes de conjugaison et aboutissant à la formation de vésicules à doubles membranes appelées autophagosomes. Après que les autophagosomes aient fusionné avec les lysosomes pour donner des vésicules que l'on nomme les autolysosomes, le flux autophagique aboutira à la dégradation du matériel séquestré qui sera ensuite recyclé pour être réutilisé par la cellule, assurant ainsi un équilibre entre la biogénèse et la destruction. L'autophagie peut s'avérer sélective d'organelles ou de protéines cibles cellulaires ou exogènes. Enfin, il existe une autre voie de dégradation étroitement liée à l'autophagie et à la phagocytose, appelée autophagie non-canonique, la phagocytose associée à LC3 (LAP) [301] (**illustration 16**).



(LAP) Autophagie associé à LC3, (CMA) autophagie médiée par des chaperonnes.

Illustration 16 - Les différents types d'autophagie

•**La micro-autophagie** qui se caractérise par la formation d'une invagination directement au niveau de la membrane lysosomale permettant la séquestration et la destruction de composants cytoplasmiques pour leur dégradation. La micro-autophagie peut être sélective ou non et présente de manière constitutive mais surtout être induite suite à un stress comme toutes les autres formes d'autophagie. Les macro-et micro-autophagies peuvent englober de grandes structures telles que des organelles entières ou des protéines cytosoliques [302].

•**La CMA,** l'autophagie médiée par des chaperonnes, est une voie de dégradation par l'action directe de protéines lysosomales retrouvées uniquement chez les mammifères supérieurs. Ce mécanisme est hautement spécialisé dans la destruction de protéines cytosoliques présentant un motif peptidique de type « KFERQ » reconnu par la protéine chaperonne Hsc70 (Heat Shock Cognate 70). En effet, les substrats cytoplasmiques sont pris en charge par la protéine Hsc70 à l'aide de co-chaperrones qui assurent la liaison vers la protéine membranaire lysosomale LAMP2A (protéine 2A de membrane associée aux lysosomes), entraînant ainsi leur dégradation directement dans le lysosome [303].

9.1. La macro-autophagie (autophagie)

La macro-autophagie est le type d'autophagie le mieux caractérisé car le plus étudié. On peut scinder ce mécanisme cellulaire complexe en trois grandes étapes : l'initiation, l'élongation et la maturation (**illustration 17**). Plus de 30 protéines ATG humaines sont impliquées dans la biogénèse de l'autophagosome, initialement découvertes chez la levure dans les années 90 [292–294]. Le mécanisme moléculaire autophagique décrit ci-après concerne uniquement les mammifères. Afin de faciliter la lecture, le **tableau 7** récapitule la signification des abréviations et le rôle des protéines citées ci-après intervenant dans l'autophagie.

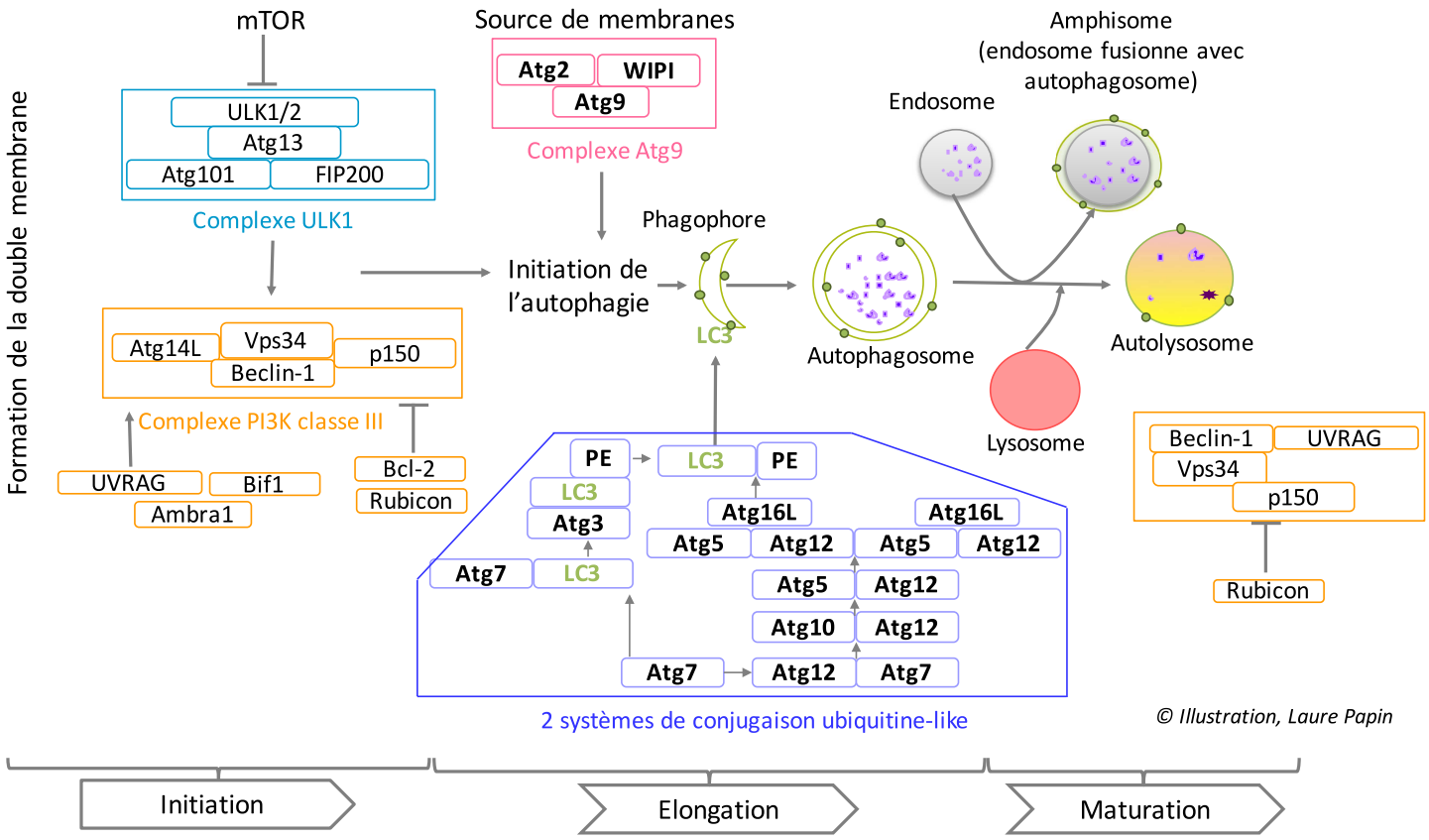


Illustration 17 - Les étapes de la macro-autophagie

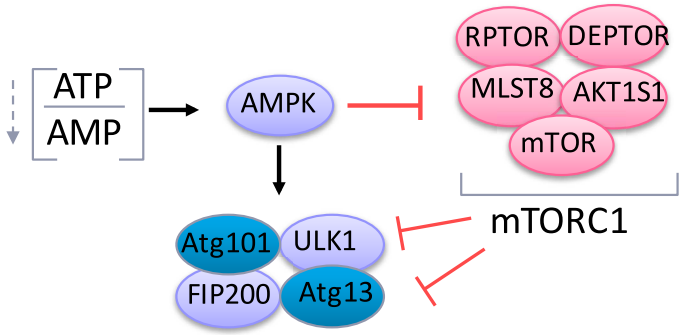
Etape du mécanisme	Complexe / système	Protéine Atg	Rôle, caractéristiques	Signification abréviation
		Atg		ATG pour « AuTophaGy-related »
		mTOR		Mammalian Target of Rapamycin
		PAS		Site d'assemblage phagophore
		l'AMPK	Senseur de la disponibilité en ATP dans la cellule et régule l'activité mTOR à travers le complexe mTORC1	Protéine kinase activée
		PI3P / PtdIns(3)P	Enrichie sur des membranes autophagosomales et endocytaires et sert à ancrer la machine autophagique à la membrane d'isolement	phosphatidyl-inositol triphosphate
		PI		phosphatidylinositol
		AMPc		Adénosine monophosphate cyclique
Initiation	**Complexe ULK**	ULK1	Sérine thréonine kinase, phosphorylée par mTORC1	Uncoordinated-51 Like Kinase 1
		Atg13	Phosphorylé par mTORC1	
		Atg101	Intéragit avec Atg13 et ULK1	
		FIP200	Scaffold for ULK1/2 and Atg13	Focal adhesion kinase family interacting protein 200 kDa
	Complexe PI3K classe III	PI3K classe 3		PI3KC3 ou activité kinase de classe III phosphatidylinositol
		Vps34	Sous unité catalytique (fonction kinase) de PI3KC3	Human vacuolar protein 34
		Beclin-1 (BECN1)	Fait parti du complexe PI3KC3, interagit avec Bcl-2, intervient aussi dans la formation et la maturation de l'autophagosome	Vps30 / Atg6 chez la levure / BH3-only protein
		Atg14L		Levure Atg14-like
		p150	sous unité régulatrice de PI3KC3, recrute PI3KC3 aux membranes	Vps15 chez la levure

Etape du mécanisme	Complexe / système	Protéine Atg	Rôle, caractéristiques	Signification abréviation
Nucléation	**Régulateur positif du complexe PI3KC3**	DFCP1	Se lie au PI3P, se localise au niveau de l'omégasome en condition de carence	Double protéine contenant le domaine FYVE 1
		Ambra1	Protéine d'échafaudage spécifique à un mammifère, dont l'interaction avec Beclin 1 est régulée à la fois par le lymphome cellulaire ULK1 et B (BCL-2) / un régulateur positif de la macroautophagie. AMBRA1 interagit avec BECN1 et ULK1, modulant leur activité.	Autophagy/beclin-1 regulator 1
		UVRAG		UV radiation resistance-associated
		Bif1	Une protéine qui interagit avec Beclin-1 via UVRAG et est nécessaire pour la macroautophagie	Beclin 1-binding protein
	Régulateur négatif du complexe PI3KC3	Rubicon	Beclin- 1-interacting protein, protéine inhibitrice d'autophagie en se fixant sur le complexe PI3K classe III	RUN domain and cystein-rich domain containing / also called p120 and Baron
		Bcl-2	interaction avec Beclin-1 entrainant l'inhibition de l'autophagie	B-cell lymphoma-2
Elongation / maturation	**Système de conjugaison Atg5-12/16L1**	Atg5	Conjugué d'Atg12	
		Atg12	protéine de type ubiquitine, conjugué à Atg5 et active Atg3	
		Atg16L1	Se lie à Atg5-Atg12, et lie LC3	
		Atg7	enzyme de type E1, active Atg12 et les homologues de LC3	
		Atg10	enzyme E2-like de conjugaison, se lie à Atg12	
		LC3A, B, C	Protéines ubiquitine-like qui recrute les cargos vers les autophagosomes et aide à la fusion/fermeture membranaire (maturation)	protéine associée aux microtubules 1A / 1B-chaîne légère 3
		GABARAP GABARAPL1,2,3		Gamma-AminoButyric Acid type A (GABA(A) Receptor-Associated Protein
		Atg4	cysteine protéase clive l'argine C terminale des protéines Atg8	
		Atg3	Enzyme de type E2	
	Complexe Atg9	Atg9 A et B	Protéine requise pour la formation des autophagosome et l'apport de membrane plasmique	Atg transmembranaire. Elle est composée de 6 repliements intra-membranaires
		Atg2 A et B	Une protéine qui interagit avec Atg18; Dans les cellules mutantes atg2D Atg9 s'accumule principalement au PAS	
		WIPI (Atg18)	Se lie au PI3P, WIPI2 recrute le complexe Atg5-12-16L1 et à Atg2 pour le recrutement d'Atg9	WD-repeat protein interacting with phosphoinositides

Tableau 7 - Signification de l'abréviation et rôles des protéines Atg impliquées dans l'autophagie

9.1.1. L'initiation

L'autophagie est un mécanisme hautement inductible sous le contrôle de nombreux stimuli, entre autres la détection de carence nutritive ou de la variation de quantité de certains substrats (cytokines, dérivés réactifs de l'oxygènes (ROS)…). Les signaux et stimuli vont notamment pouvoir être captés par la protéine kinase principalement responsable de la régulation de l'autophagie : **mTOR** contenue dans le complexe mTORC1 [304]. Par ailleurs, d'autres kinases que mTOR, telle que AMPK, peuvent aussi contrôler l'autophagie en phosphorylant directement ou indirectement ULK1 [305]. L'AMPK reconnaît l'AMPc due à une consommation massive d'ATP perçu comme une carence énergétique (**illustration 18**). mTOR agit sur le **complexe ULK1 qui est composé des protéines ULK1/2 - Atg13 - FIP200 - Atg101** [306]. mTOR est un régulateur négatif d'autophagie, c'est à dire qu'en condition basale (sans carence nutritive), mTOR est actif et phosphoryle la sérine/thréonine kinase ULK1 et Atg13 [304]. ULK2, semble doté des mêmes capacités que ULK1 dans l'autophagie [307]. Le complexe ULK ne peut alors pas alimenter la transduction de signaux et en conséquence l'autophagie est inhibée. En revanche, en condition de stress métabolique, la kinase mTOR devient inactive et se dissocie du complexe ULK laissant les kinases ULK1 et ULK2 fonctionnelles pour s'autophosphoryler et phosphoryler leurs partenaires présents dans le complexe, notamment Atg13 et FIP200 [306]. Le complexe ULK va alors être relocalisé vers le site de formation de l'autophagosome sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Le site de formation du phagophore et la source de membranes fournissant la biogénèse de cet organite à double membranes est encore sujet à débat dans la communauté scientifique à l'heure actuelle (chapitre D.9.1.3.5). Aujourd'hui, il est connu que chez la levure les autophagosomes sont formés sur un seul site nommé **PAS** (site d'assemblage phagophore ou structure pré-autophagosomale) alors que chez les cellules de mammifères, il existe plusieurs sites de ce type simultanément [308]. Presque toutes les protéines ATG nécessaires à la formation de l'autophagosome sont localisées au niveau du PAS [309].



Inspiré de : Galluzzi L., et al., Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potentialand persisting obstacles, Nature Review Drug Discovery, 2017

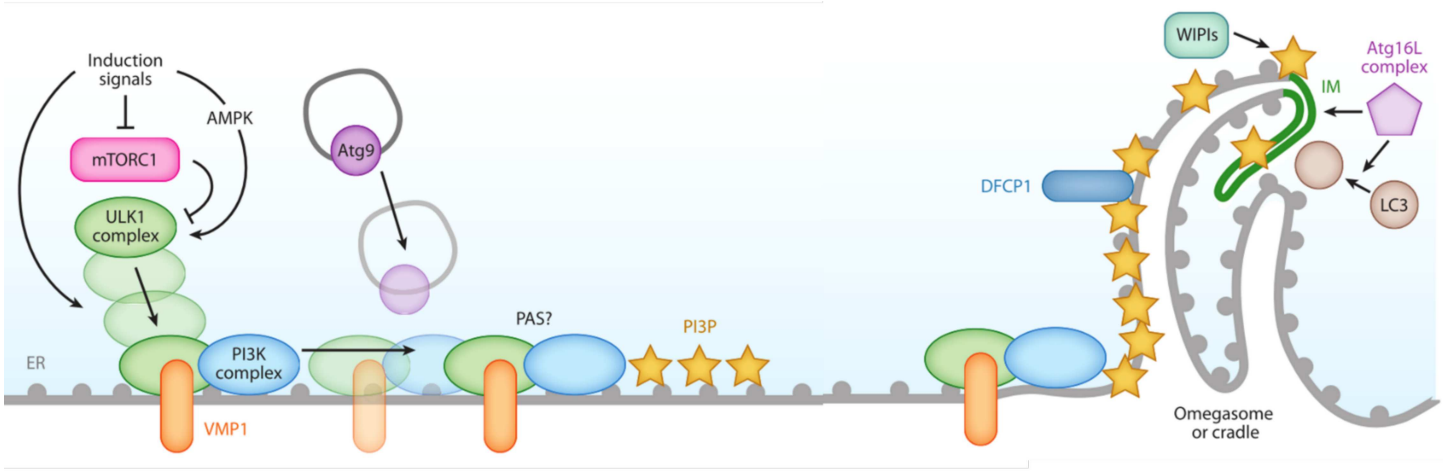
Illustration 18 - L'initiation de l'autophagie

9.1.2. La nucléation : formation du phagophore

S'en suit alors le recrutement d'un autre complexe essentiel, le **complexe PI3K classe III** ou PI3KC3 **– Beclin-1** composé chez les mammifères des protéines **Vps34** – **Beclin-1** ou BCN1 - **Atg14L** et **p150** [310]. Vps34 est la sous-unité catalytique du complexe PI3KC3, Beclin-1 et p150 sont deux sous-unités régulatrices. Atg14L est un régulateur positif de l'autophagie nécessaire pour l'activité de Vps34 et de la kinase p150 [311] (**illustration 17).**

Concrètement, la phosphorylation de Beclin-1 par le complexe ULK induit l'activité PI3-kinase du complexe PI3KC3 – Beclin-1 entraînant ainsi la production de PI3P (Phosphatidyl-Inositol 3 Phosphate) par VPS34 [312]. En effet, grâce à son activité PI3-kinase, le rôle du complexe PI3KC3 – Beclin-1 est de générer ce PI3P à partir de substrat inositol phosphate (PI). Ce phosphatidylinositol constitue une famille de phospholipides dans laquelle sont présentes différentes formes phosphorylées (phosphoinositides) et qui compose des domaines membranaires des cellules eucaryotes. Dans le cas de l'autophagie, la production de PI3P est essentielle pour l'allongement du phagophore et le recrutement d'autres protéines de liaison au PI3P au phagophore [313]. En effet, la génération de PI3P permet de fournir un signal lipidique nécessaire au recrutement d'effecteurs cellulaires permettant l'initiation du phagophore tels que DFCP1 et les membres de la famille WIPI [314,315].

Des protéines régulatrices supplémentaires vont ensuite venir se complexer à Vps34 et Beclin-1 au niveau du site de nucléation du phagophore. Ce processus apparaît très finement régulé avec l'association de facteurs spécifiques, comme UVRAG, BIF-1, Atg14L et Ambra, permettant de favoriser l'autophagie (initiation du phagophore), [316,317] alors que le recrutement d'autres protéines, telles que Rubicon et Bcl-2, induirait plutôt une inhibition de l'induction autophagique. Rubicon possède deux rôles décrits : un premier consistant à inhiber l'activité lipide kinase du complexe PI3KC3 en interagissant avec Vps34 et un deuxième lors de la maturation en régulant négativement la fusion autophagosome-lysosome par interaction avec le complexe UVRAG [318]. Concernant Bcl-2, cette protéine anti-apoptotique peut inhiber l'autophagie durant cette étape de nucléation en séquestrant Beclin-1 du complexe PI3K [319]. Lors d'un stress, Beclin-1 se dissocie de Bcl-2, permettant l'activation de PI3KC3 et la stimulation de l'autophagie. Il a été suggéré qu'une zone particulière du RE riche en PI3P, due à l'action du complexe PI3KC3, était à l'origine du recrutement de protéines ATG, initiant ainsi le processus de formation du phagophore. Cette zone a été appelée **omégasome** de par sa forme particulière en Ω [320]. C'est une de ces zones plateforme orientée vers le cytosol qui va permettre la déformation de la membrane (flexion et fission, attache et fusion) et le mouvement des vésicules pour la formation du futur autophagosome naissant (**illustration 19**).



Source : Tous les droits sont réservés à Mizushima N., et al., The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2011

Illustration 19 - La nucléation : Du recrutement des protéines initiant l'autophagie à la formation du phagophore (PAS) au niveau de l'omégasome

9.1.3. L'élongation

Nous avions évoqué précédemment que la production de PI3P permet le recrutement de certaines protéines capables de les reconnaitre et s'y lier, comme les protéines DFCP1 et les protéines de la famille WIPI (**illustration 19**). Plusieurs protéines WIPI ont été montrées comme étant particulièrement importantes pour la formation du phagophore. C'est le cas par exemple de la protéine WIPI2 qui recrute le complexe Atg5-Atg12/Atg16L1 par liaison directe à Atg16L1 [321]. Justement, l'expansion membranaire (l'élongation) du phagophore naissant est particulièrement dépendante de l'action de deux systèmes de conjugaison fonctionnellement similaires à des systèmes d'ubiquitination. Ces deux systèmes de conjugaison dépendent d'une enzyme E1-like ATG7 qui peut initier les 2 systèmes parallèlement en activant ATG12 et/ou ATG8 dont les détails mécanistiques sont décrits ci-après (**illustration 17**).

9.1.3.1. Le système de conjugaison Atg5-Atg12/Atg16L1

Atg12 est une protéine de type ubiquitine qui, comme l'ubiquitine, se lie de manière covalente aux substrats via le groupe carboxyle de sa glycine C-terminale. Atg7 est considérée comme une enzyme de type E1, cela signifie qu'elle active la glycine C-terminale d'Atg12 qui est ensuite transférée à l'enzyme E2-like de conjugaison Atg10, avant de former un conjugué avec Agt5. Le complexe Atg5-12 va alors former un premier complexe non covalent avec Atg16L1 [322]. L'emplacement de ce complexe précédemment recruté par des protéines adaptatrices type WIPI2, contribue à définir les sites de formation des autophagosomes. Ce système d'élongation Atg5-Atg12/Atg16L1 va alors agir comme

une enzyme E3 (une ubiquitine ligase) pour initier une réaction catalysant la conjugaison du deuxième système de protéines autophagiques de type ubiquitine.

9.1.3.2. Le système de conjugaison de la famille Atg8

Chez les mammifères, la famille Atg8 compte 7 protéines LC3A/B/C, GABARAP, GABARAPL1/2/3 alors que chez la levure il n'y a qu'une seule protéine Atg8. Les protéines mammifères de la famille Atg8 sont des ubiquitine-like protéines, comportant des résidus arginine en position C-terminale, qui sont reconnus et éliminés par la cystéine-protéase Atg4, laissant ainsi exposé un résidu glycine à l'extrémité C-terminale. Par la suite, Atg7 (E1) active le résidu glycine C-terminal des Atg8 (Atg8-I), puis l'enzyme de type E2 Atg3, avec l'aide du complexe ATG12-5/16L1 intervenant en tant qu'E3 ligase, conjuguent Atg8 au lipide PE (phosphatidyléthanolamine). La conjugaison d'Atg8 au PE entraine son association étroite avec les membranes autophagosomales [323]. Le conjugué Atg8-PE aussi appelé Atg8-II ou LC3-II, semble fondamental pour achever la formation de l'autophagosome car il est impliqué dans la fermeture des membranes. On le retrouve très abondamment sur les membranes internes et externes des autophagosomes jusqu'à leur dégradation dans les lysosomes, faisant de lui un marqueur de la voie autophagique (Atg8/LC3).

9.1.3.3. La protéine LC3 B

Il est intéressant de noter que la protéine LC3 B est considérée comme un bon marqueur autophagosomal, car elle est retrouvée exprimée par la plupart des organelles autophagiques, il est possible de suivre le flux autophagique par western blot en comparant la quantité de LC3-II (la forme lipidée) à un gène de ménage ou en comparant les formes lipidée LC3-II (18 kDa) et non lipidée LC3-I (15 kDa) [324], observées respectivement en western blot aux poids 17 kDa et 19 kDa. Toujours selon ces mêmes guidelines, pour étudier le flux autophagique c'est à dire le mécanisme autophagique dans son entièreté jusqu'à la dégradation protéique il est suggéré d'utiliser des drogues bloquant la dégradation lysosomale : l'utilisation d'inhibiteurs de protéases lysosomales (par exemple la Pepstatine A, la leupeptine et E-64d) ou de de l'ATPase vacuolaire proton-dépendante V-ATPase H+ (par exemple la Bafilomycine A1, la Concanamycine A) ou encore des composés qui neutralisent l'acidification du pH lysosomal tel que la chloroquine ou le NH4Cl voire aussi par traitement avec des agents qui pourraient bloquer la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (par exemple le ginsenoside Ro). Par ailleurs, il est aussi possible de marquer la protéine LC3 par un anticorps ou de la sur-exprimer en fusion avec une protéine fluorescente ou un tag (ex : GFP-LC3) et de suivre les vésicules autophagiques par microscopie photonique ou électronique [324]. Enfin, nous verrons par la suite que de nombreuses protéines composées d'un motif d'interaction avec la protéine LC3 (LIR motif) peuvent agir avec la

protéine LC3 pour acheminer sélectivement une protéine ou un substrat vers sa dégradation autophagique régulant ainsi notamment le processus appelé autophagie sélective (chapitre D.10.1).

9.1.3.4. Le complexe Atg9-Atg2-Atg18 (WIPI)

La protéine de liaison au PI3P Atg18 / WIPI et son partenaire de liaison Atg2 sont recrutés comme une plateforme pour le transport et le recrutement d'Atg9 [325]. Bien que la fonction exacte d'Atg2-Atg18 / WIPI dans la biogenèse de l'autophagosome ne soit pas claire, il a été démontré que le complexe Atg2-Atg18 est nécessaire lors de l'étape de nucléation pour la distribution des vésicules Atg9 au site de PAS [309] (**illustration 19**). Les levures déficientes en Atg9 ne présentent pas de défauts de croissance évidents en milieux riches, mais présentent un taux de survie réduit [326,327]. La première étude de caractérisation de la protéine mammifère Atg9 (parfois appelée mAtg9 pour Atg9 de mammifère) a été réalisée par l'équipe du Docteur Tooze *et coll.,* en 2006 [328]. Atg9 est l'un des seules protéine autophagique transmembranaire identifiée, elle possède 6 domaines transmembranaires et est exprimée à la surface des membranes du TGN (réseau trans-Golgien) (co-localisant avec les marqueurs TGN46 et Rab6), des endosomes précoces, de recyclage et tardifs (co-localisant avec Rab7 et 9) [328–330]. Nous verrons par la suite que de par sa structure particulière cette protéine contribue à l'apport de lipides membranaires pour alimenter la biogénèse autophagosomale (**illustration 20**).

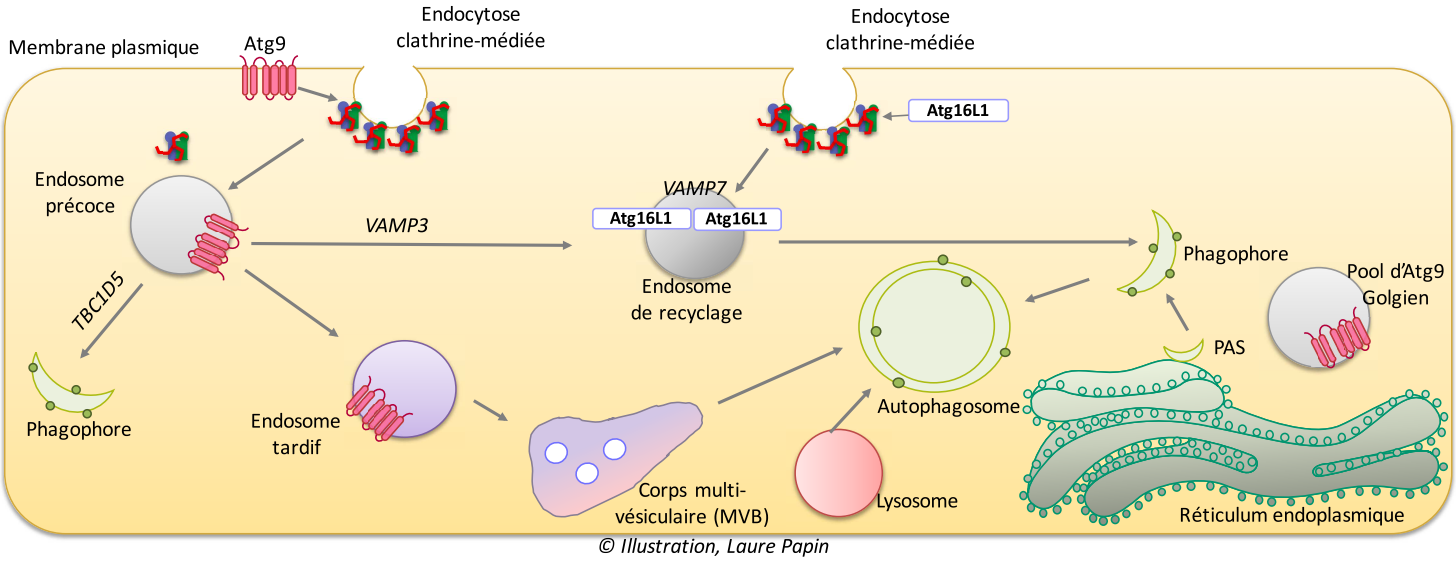


Illustration 20 - Les protéines Atg9 et Atg16L1 contribue à l'apport de membranes provenant de la membrane plasmique pour la formation de l'autophagosome

9.1.3.5. L'origine des membranes autophagosomales

À l'heure actuelle, l'origine des membranes autophagosomales est toujours sujet à débat dans la communauté scientifique car elle semble multiple et dépendante du stress généré, de l'organisme, du type cellulaire étudié, d'autant plus que l'environnement et le contexte métabolique influencent fortement la mise en place et la régulation de la voie autophagique [331]. Une fois que les deux systèmes de conjugaison initient l'élongation du phagophore, pour la progression de la croissance de cet organite, il a été décrit que diverses organelles pouvaient fournir des membranes comme le RE [332] ou prend forme l'omégasome région riche en PI3P [320], les mitochondries [333], le réseau trans-Golgien (TGN) [317] ou encore la membrane plasmique [329,330].

Des travaux menés par l'équipe du Docteur Rubinsztein et *coll.* ont montré que des composants de précurseurs autophagosomaux précoces pouvaient être retrouvés à la membrane plasmique, ces données indiquent donc que la membrane plasmique est une source supplémentaire de membrane pour l'autophagosome [334]. En effet, cette étude révèle que des vésicules pré-endosomales générées par l'endocytose clathrine médiée deviennent des plateformes d'assemblage pour les autres composants autophagiques formant les membranes autophagosomales. En effet, cette étude montre que la protéine Atg16L1 est capable de s'associer à des puits enduits de clathrine au niveau de la membrane plasmique grâce à son interaction avec la protéine AP2 de l'adaptateur de clathrine [334] (**illustration 20**). Le marquage de la membrane plasmique par différents colorants à liaison lipidique a montré que la membrane plasmique s'attache d'abord à Atg16L1 puis à des autophagosomes $LC3^+$ suggérant qu'Atg16L1 associé à la membrane plasmique permet l'apport de membrane lipidique pour la biogénèse autophagosomale [330,335]. De façon intéressante, il a aussi été montré que si l'endocytose dépendante de la clathrine est inhibée, alors la biogenèse des autophagosomes est réduite, illustrant ainsi l'importance de la participation du trafic endosomal et de l'apport de membranes plasmiques dans le mécanisme de l'autophagie. L'autophagie et les voies endosomales partagent le même ensemble de lipides et de protéines, renforçant l'idée que ces voies sont intimement interconnectées et que la dynamique du processus autophagique peut être considérée comme un processus de trafic membranaire [336] (**illustration 20**). Par la suite, l'équipe du Docteur Rubinsztein et *coll.* a montré qu'Atg9 aussi peut transiter à partir de la membrane plasmique vers les endosomes de recyclage en passant par les endosomes précoces en suivant donc la voie endosomale classique, un pool d'Atg9 est aussi retrouvé résident au niveau du réseau Golgien (TGN) [330]. Les protéines Atg9 et Atg16L1 ont été retrouvées associées dans des puits distincts recouverts de clathrine au niveau de la membrane plasmique suggérant que ces deux protéines contribuent à l'apport de membrane pour l'autophagosome via des voies différentes, Atg9 suit une voie dépendante de l'endosome précoce et la voie d'Atg16L1 est indépendante de l'endosome précoce via le réseau de protéines SNAREs [330,337].

En effet Atg16L1 va subir des fusions homotypiques via le réseau de protéine SNARE (notamment VAMP7) et ces vésicules vont pouvoir fusionner (fusion hétérotypique via une autre SNARE, VAMP3) avec des vésicules Atg9^{+} donnant des vésicules Atg16L1-Atg9 capable d'alimenter la biogénèse autophagosomale [338] (**illustration 20**).

•La protéine transmembranaire Atg9 : De façon très intéressante, il a été décrit que la protéine Atg9 pouvait intervenir comme un support pour l'apport de membranes plasmiques, permettant une extension supplémentaire du phagophore. Atg9 semble aussi s'associer aux précurseurs d'autophagosomes au début de leur biogenèse [329]. L'inhibition d'Atg9 (siRNA) dans les cellules HEK293T inhibe la lipidation de LC3 et la dégradation des protéines suggérant qu'Atg9 est essentielle pour l'initiation de la voie autophagique dans les cellules de mammifères [328]. De façon à appuyer cela, des souris knock-out Atg9 ont été générées et Atg9 s'est alors avéré être nécessaire pour la survie immédiatement après la naissance, un phénotype identique à celui observé avec les souris Atg5 knock-out [339]. En fonction des conditions nutritives, Atg9 subit un mouvement dynamique entre le site d'assemblage phagophore (PAS) ou TGN, où le phagophore est nucléé vers les sites périphériques qui peuvent permettre l'apport de membrane pour l'expansion du phagophore [328,330]. En condition de carence nutritive (ou ajout de rapamycine), ce pool d'Atg9 périphérique co-localise avec Rab7 (marqueur des endosomes tardifs) et LC3 (marqueur des autophagosomes) interagissant avec les autophagosome sans pour autant y être incorporé [329]. La modification de la répartition et relocalisation d'Atg9 est dépendante de l'activité de la kinase ULK1 et de la protéine Bif-1 (observé par siRNA) [317,328]. La protéine Rab GTPase activatrice TBC1D5 et Atg9 interagissent avec AP2 (clathrine) contribuant ainsi au tri correct des vésicules clathrine médiées lors de l'initiation de l'autophagie. En effet, lors de l'activation de l'autophagie, TBC1D5 se dissocie du complexe initial et s'associe à Atg9 et à ULK1 activé pour contribuer à l'apport de membrane à l'autophagosome en cours de formation [337] (**illustration 20**).

9.1.3.6. L'amphisome : un croisement entre la voie endosomale et la voie autophagique

Juste avant la maturation de l'autophagosome, cette organelle va pouvoir fusionner avec des endosomes précoces ou tardifs [340] ou encore des corps multi-vésiculaires MVB [341], formant ainsi des amphisomes (**illustrations 20 et 21**). Les travaux du Docteur Tooze *et coll.* ont notamment fourni des preuves directes que la fusion des endosomes précoces avec des vésicules autophagiques est une condition préalable à la maturation des vacuoles autophagiques et qu'elle se produirait avant la fusion avec des endosomes tardifs et des MVB [340].

Les grandes familles protéiques régissant la signalisation, le trafic et la fusion vésiculaire sont fortement impliquées dans ce processus, telles que les protéines transmembranaires SNARES qui sont

les principales protéines régulant les fusions vésiculaires et le trafic membranaire cellulaire. Les SNARES VAMP3 et VAMP7 (protéines associées aux membranes vésiculaires) sont nécessaires pour permettre séquentiellement aux autophagosomes de fusionner avec des endosomes et ensuite des lysosomes [342]. Aussi on retrouve impliqué dans la formation de l'amphisome la famille des Rabs et des Rho-GTPases qui sont impliquées dans plusieurs étapes du trafic membranaire, y compris la formation de vésicules, le mouvement des vésicules le long des réseaux d'actine et de tubuline et la fusion membranaire. Les protéines Rab7 [343] et Rab11 [344] favorisent la fusion entre endosome tardif et autophagosome en condition de carence nutritive. Aussi, le complexe ESCRT (Complexe de tri endosomal requis pour le transport) semble important pour la fusion des MVB et endosomes avec les autophagosomes [341,345] (**illustration 21**).

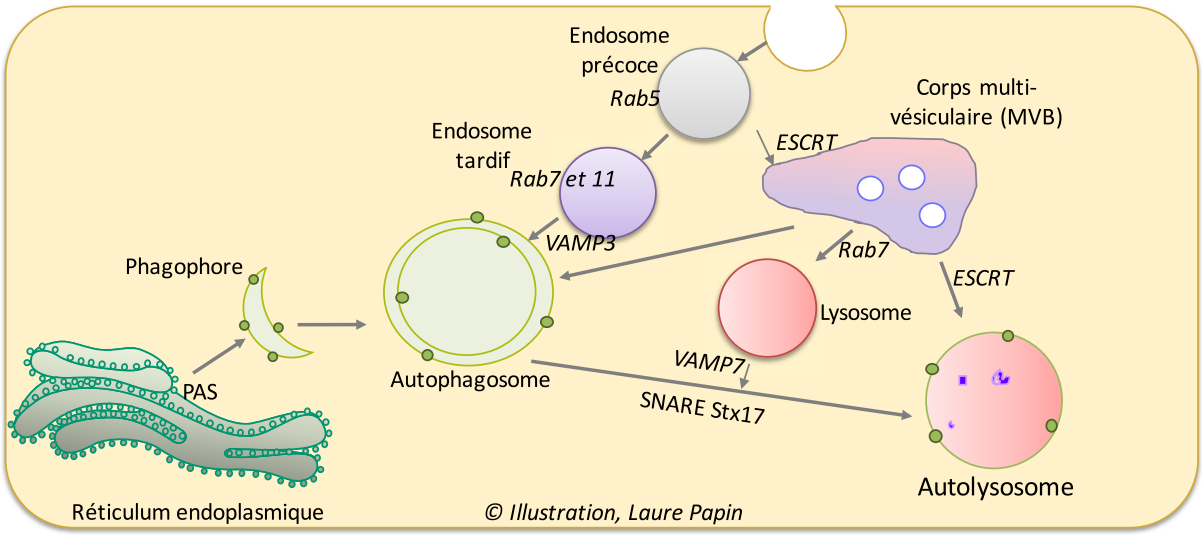


Illustration 21 - La contribution de la voie endosomale dans l'autophagie

9.1.3.7. La maturation

Au fur et à mesure que la membrane autophagosomale croît et commence à se fermer, elle séquestre en elle des matières cytoplasmiques (protéines ou organites entiers) destinées à être livrées aux lysosomes pour la dégradation. Les autophagosomes vont alors fusionner avec les lysosomes pour donner des vésicules transitoires que l'on nomme les autolysosomes, et le flux autophagique aboutira à la dégradation du matériel séquestré qui sera ensuite recyclé pour être réutilisé par la cellule. Comme énoncé précédemment dans le chapitre D.9.1.2, la protéine UVRAG participe à l'initiation de l'autophagie et régule positivement les étapes plus tardives de maturation et de fusion autophagosome/lysosome dans un complexe avec PI3KC3 et Beclin-1. Cette régulation peut être inhibée par la protéine Rubicon qui peut se lier à la protéine UVRAG [316] (**illustration 17**).

Comme pour la plupart des organelles cellulaires, le cytosquelette ainsi que les réseaux de protéines cellulaires liés au trafic vésiculaires sont impliqués dans la fusion de l'autophagosome et du lysosome. Lors de la maturation de l'autophagosome en autolysosome, la protéine SNARE Stx17 (syntaxine 17) est recrutée sur la membrane externe de l'autophagosome, interagit avec SNAP-29 (Q-SNARE) et VAMP8 (R-SNARE) (retrouvé à la membrane des endosomes / lysosome) permettant ainsi la fusion autophagosome/lysosome [346]. La protéine Rab7 exerce un rôle important dépendant des protéines membranaires lysosomales Lamp1 et Lamp2 dans la maturation finale des vacuoles autophagiques lors de la fusion autophagosome/lysosome [343] (**illustration 21**).

9.2. La phagocytose associée aux protéines LC3 (LAP), autophagie non canonique

La LAP pour « LC3-associated phagocytosis » n'est pas un sous-type d'autophagie à proprement parlé, cette voie de dégradation est le résultat comme son nom l'indique du croisement entre la phagocytose et l'autophagie, décrit chez les mammifères (**illustration 16**). C'est ce que l'on appelle une voie d'autophagie non-canonique, ne dépendant pas des composants classiques de la machinerie autophagique. Dans ce processus, les signaux de danger générés lors de l'absorption de particules ou de pathogènes par des cellules phagocytaires induisent le recrutement au phagosome de composants de la machine d'autophagie comme la protéine LC3 [347]. L'association de LC3 au phagosome favorise et accélère sa fusion avec les lysosomes (maturation du phagosomes, génération du phagolysosome). La LAP est donc un mécanisme de défense immunitaire innée participant à la dégradation accélérée de pathogènes comme des champignons [348] ou encore de bactéries [349]. Comme pour la macro-autophagie l'attachement de LC3 au phagosome est dépendant de Beclin-1, Atg5 et 7 et de la génération de PI3P. Les deux mécanismes partagent aussi la participation de plusieurs protéines telles que BECN1, VPS34, UVRAG, Atg3, Atg12 et Atg16L1 [348,350]. Mais contrairement à la macro-autophagie, la vésicule catalytique formée est un phagolysosome ne possédant qu'une seule membrane et dont la formation est indépendante des protéines clé du complexe de pré-initiation macro-autophagique ULK1, mais aussi des protéines Atg14 et AMBRA1 [348]. De plus, certaines protéines sont associées à ce mécanisme de LAP telles que les protéines Rubicon et NADPH oxydase 2 qui ont pour rôle d'accélérer la dégradation et qui sont dispensables à l'élaboration de la macro-autophagie [348]. De manière intéressante, il a été décrit très récemment que le VIH-1 pouvait détourner la LAP via la protéine virale Vpu qui interagit avec LC3C afin de contrer l'action antivirale du facteur de restriction BST2 dont nous avions évoqué le mode d'action dans le chapitre D.9.2 [289].

10. L'AUTOPHAGIE SELECTIVE (AS)

Avec le temps, il devient de plus en plus clair que l'autophagie est un processus cellulaire complexe finement régulé, c'est pourquoi son caractère sélectif et spécialisé ne cesse d'être révélé contrastant avec son image de processus dégradatif de masse et aléatoire comme décrit auparavant (chapitre D.9.1). En fonction du stress et du type cellulaire, la réponse autophagique peut en effet s'avérer ciblée et spécifique, rendant ce mécanisme essentiel par exemple dans la réponse aux pathogènes. L'AS peut être impliquée dans la dégradation d'organites présents en excès dans la cellule ou des organites défectueux [351], le mécanisme d'AS impliqué prend alors le nom de l'organite en question et met en jeu des récepteurs autophagiques (RA) (**illustration 16 et 22A**). On retrouve par exemple la ribophagie (ribosomes) [352], la mitophagie (mitochondrie) [296] ou encore la péxophagie (peroxysomes) [353]. Plus généralement la dégradation sélective de pathogènes intracellulaires par voie autophagique est appelé xénophagie désignant ainsi la dégradation de substrat étranger à l'organisme « *-xéno* » signifiant étranger [354] (voir chapitre D.11).

A : L'autophagie sélective. (Ub) Ubiquitine, (Gal) Galectine.

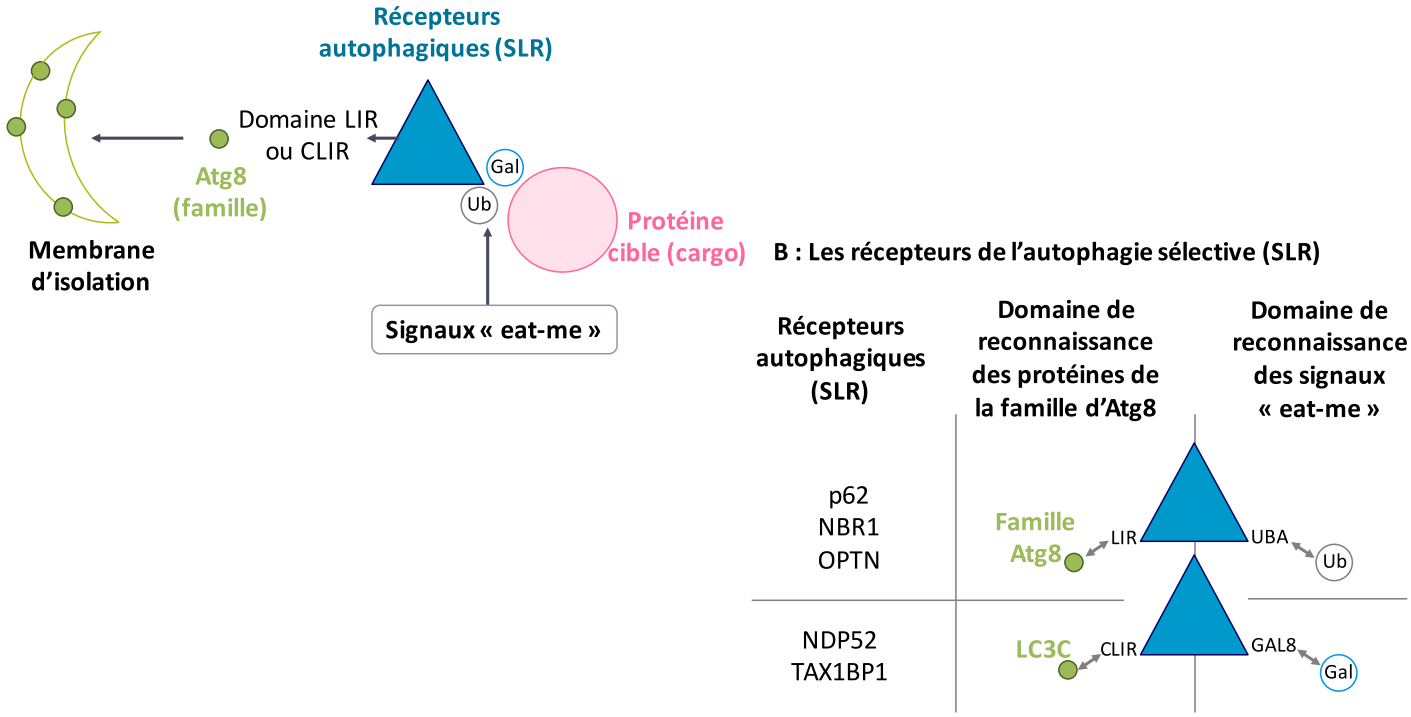


Illustration 22 - A : L'autophagie sélective, B : Les récepteurs de l'autophagie sélective (SLR)

10.1. L'autophagie sélective médiée par des récepteurs adaptateurs

Par ailleurs, l'autophagie sélective peut se restreindre à une cible exo ou endogène, souvent appelée cargo, liée à un signal spécifique (ubiquitine et/ou galectine) reconnu par un récepteur/adaptateur autophagique (RA) agissant comme une navette capable d'acheminer le cargo marqué vers la dégradation autophagique (**illustration 22A**). Un récepteur autophagique est défini comme étant toute protéine pouvant se lier à des substrats autophagiques, permettent leur reconnaissance par la machinerie autophagique et se dégradant dans les lysosomes au cours de la réponse autophagique fonctionnelle [355]. Ces RA possèdent des caractéristiques communes comme par exemple le fait qu'ils sont dégradés en même temps que le substrat qu'ils acheminent vers le phagophore et leur absence d'expression n'affecte pas le processus autophagique dans son intégralité, confirmant ainsi leur caractère spécifique. Aussi les RA possèdent un domaine de liaison à la protéine cargo soit directement, soit indirectement (via l'ubiquitine et/ou la galectine) ou soit par l'intermédiaire de domaines de liaison aux membranes (transmembranaires) permettant l'interaction avec le cargo [356].

10.2. La liaison des RA aux membres de la famille Atg8

Ces récepteurs autophagiques partagent tous la capacité de se lier aux membres de la famille Atg8 mentionnés précédemment dans le chapitre D.9.1.3.2. Cette liaison est permise notamment grâce à l'expression d'un domaine conservé appelé LIR (région interagissant avec LC3), qui selon une étude comparative de différents RA, reposerait sur une séquence consensus comme étant [W/F/Y]xx[L/I/V] [356]. L'interaction avec un membre de la famille Atg8 permet au RA lié à son cargo d'être acheminé vers les membranes autophagosomales. Cependant toutes les protéines possédant un domaine LIR ne se lient pas obligatoirement aux protéines de la famille Atg8 de même que certaines protéines peuvent permettre la dégradation par autophagie sélective sans pour autant exprimer un domaine LIR.

À l'heure actuelle, la liste des RA ne cesse de croitre. D'après la comparaison de plusieurs RA, il est possible de les classer en fonction de leur spécificité de liaison et de leur composition protéique. On retrouve le groupe des SLR (récepteur similaire au sequestosome) car ces récepteurs partagent les mêmes caractéristiques que le premier récepteur adaptateur identifié (p62, SQSTM1, sequestosome), un groupe de récepteur associés à la mitophagie et un groupe de récepteur spécialisés (Cbl et Stbd1) [356] (**illustration 22B**). Parmi les cinq SLR les mieux caractérisés on retrouve par exemple p62 [357] et NBR1 (neighbour of BRCA1 (breast cancer early-onset 1) gene 1) [358] qui possèdent une région UBA (un domaine de liaison à l'ubiquitine), l'OPTN (optineurine) [359] possédant un domaine UBAN (ubiquitine binding ABIN in NEMO) de liaison à l'ubiquitine ou encore NDP52 (protéine nucléaire 52) [360] et TAX1BP1 possédant un domaine UBZ ubiquitine « en doigt de zinc » leur permettant de reconnaître l'ubiquitine et la galectine pour NDP52.

10.3. La liaison cargo - RA : Ubiquitine, galectine

•**L'ubiquitine** est une petite protéine de 76 acides aminés très conservée et retrouvée chez tous les organismes Eucaryotes. Le processus d'ubiquitination s'opère sur les résidus lysine des protéines et consiste en l'étiquetage covalent de l'ubiquitine sur la protéine cible via une cascade enzymatique comportant 3 classes d'enzymes. Tout d'abord, l'enzyme E1 active la molécule d'ubiquitine de manière ATP-dépendante en formant une liaison intermédiaire covalente (thioester) entre un groupe actif de cystéine exprimé par l'enzyme E1 elle-même et l'extrémité C de l'ubiquitine. L'enzyme E1 se lie ensuite à l'enzyme E2, également appelée enzyme de conjugaison de l'ubiquitine, qui accepte l'ubiquitine via le résidu catalytique de cysteine. Enfin, l'ubiquitine ligase E3, en complexe avec E2, facilite le transfert du fragment ubiquitine vers le substrat protéique cible en formant une liaison isopeptidique, habituellement entre un résidu lysine (de la protéine cible) et le résidu glycine C-terminal de l'ubiquitine [361]. C'est l'ubiquitine ligase E3 qui détermine la spécificité du substrat et il en existe donc un nombre assez important dans les cellules Eucaryotes. La superfamille des E3 ubiquitine ligases peut être classée en quatre familles majeures en fonction des domaines protéiques exprimés : RING (Really Interesting New Gene), HECT (homologous to E6-associated protein C-terminus), U-box (UFD2 homology), et RBR (RING-in-between-RING) [362]. L'ubiquitination d'une part, peut être simple, on parle alors de mono-ubiquitination qui joue globalement un rôle dans la signalisation protéique. D'autre part elle peut être multiple (poly-ubiquitination) consistant à générer une chaine de molécule d'ubiquitine ayant pour rôle d'acheminer la protéine marquée vers la dégradation protéasomale et autophagosomale [363]. En terme de signalisation ubiquitine dépendante on retrouve notamment l'implication de l'ubiquitination dans l'endocytose clathrine médiée ainsi que dans le trafic et la signalisation de récepteurs et vésicules liée à la machinerie endosomale [364]. De plus, l'ubiquitination protéique (généralement poly-ubiquitination) peut conférer une sélectivité de dégradation via la voie autophagique [365].

Par exemple, p62 contient un domaine PB1 N-terminal (Phox et Bem1p), un motif LIR et un domaine C-terminal UBA (associé à l'ubiquitine). Le domaine PB1 est composé aux extrémités de domaines chargés de manière opposée permettant à p62 d'interagir avec lui-même et formant ainsi des multimères. La multimérisation de p62 est essentielle pour la dégradation sélective autophagique de ce RA. p62 lie l'ubiquitine via le domaine UBA en position C-terminale. La multimérisation et la capacité de liaison à l'ubiquitine permettent à p62 de regrouper le cargo ubiquitinylé. Son motif LIR favorise l'interaction avec LC3 et est nécessaire pour la dégradation des structures contenant p62 via la voie autophagique [366]. La caractérisation de p62 en tant que RA a contribué à la compréhension de l'autophagie médiée par les récepteurs et a été étudié pour son rôle dans l'élimination des agrégats de protéines (agréphagie). Néanmoins, il existe certains exemples montrant que les RA ne sont pas toujours nécessaires pour l'élimination de substrats ubiquitinylés par voie autophagique. Par exemple,

lors de l'endocytose de la bactérie Salmonella, des protéines cellulaires endosomales vont être ubiquitinylées et l'ubiquitine va directement être reconnue par Atg16L1 de façon indépendante des récepteurs autophagiques et LC3 [367].

•**Galectine** : Les galectines sont des lectines cytosoliques de type S comme mentionné dans le chapitre B.5.2.4.1, qui reconnaissent des glycoconjugués contenant du ß-galactoside exposés par exemple à la surface membranaire d'organelles, lors d'altérations endomembranaires durant la pénétration ou l'échappement vésiculaire de pathogènes dans le cytosol. Les galectines 3, 8 et 9 sont impliquées lors de l'entrée de certaines Entérobactéries dans la cellule [80,368]. Récemment il a d'ailleurs été montré que l'Adénovirus pouvait aussi induire le recrutement des galectines 3 et 8 lors de son échappement endosomal [369,370]. Suite à la reconnaissance de signaux de danger issus de ruptures de membranes, certaines galectines vont pouvoir recruter des RA [371]. C'est par exemple le cas de NDP52 qui peut d'une part être recruté directement par son domaine UBZ par des bactéries enduites d'ubiquitine, et d'autre part se lier à la galectine 8, elle-même associée aux ß-galactosides exposés sur les vacuoles endommagées (endosomes ou lysosomes) contenant des bactéries du genre Salmonella [80]. Le motif LIR atypique de NDP52, appelé CLIR, comprend le tripeptide Leu-Val-Val et se lie spécifiquement à LC3C permettant ainsi la dégradation sélective des substrats reconnus [372]. Un autre récepteur homologue à NP52, TAX1BP1 (T6BP) (Tax1 Binding Protein 1) lie l'ubiquitine et est composé du même motif LIR atypique CLIR que le NDP52 (Newman et al., 2012) son rôle dans la xénophagie a récemment été révélé dans la clairance de la bactérie de l'espèce *Salmonella typhimurium* [373].

10.4. L'autophagie de précision

Récemment une nouvelle forme de dégradation par autophagie sélective, l'**autophagie de précision**, a été décrite par l'équipe du Docteur Deretic *et coll.,* [254]. Dans cette forme d'AS, les récepteurs autophagiques impliqués sont des protéines de la famille TRIM (protéine à motif tripartite), dont nous avions déjà évoqué le rôle antiviral de certains membres de cette famille dans la partie D.2.1.2.1. Les protéines TRIM ont été considérées comme une famille sur la base de leur organisation protéique contenant généralement: un domaine RING N-terminal (domaine de liaison aux enzymes de type E2 de conjugaison à l'ubiquitine, site d'activité E3 ligase), un ou deux domaines B-box (impliqué(s) dans la multimérisation et d'autres interactions protéines-protéines) et un domaine « coiled-coil » (**illustration 23A et tableau 8**). Le cumul de ces trois motifs (d'où le nom motif tripartite), est caractéristique des protéines de la famille TRIM et peut aussi s'appeler RBCC pour Ring, B-box, Coiled-Coil [374]. Concernant le domaine C-terminal, il est variable selon les protéines TRIM et est spécifique des substrats reconnus. On peut retrouver par exemple un domaine SPRY [375]. En outre, un même domaine SPRY exprimé par une protéine TRIM peut interagir avec de nombreux partenaires et des substrats potentiels [376]. Cependant, toutes les protéines TRIM ne sont pas des E3 ligases, par exemple, TRIM20

contient des domaines : B box, CCD, et PRY/ SPRY, mais ne possède pas de domaine RING E3 ligase qui est remplacé par un domaine pyrine (PYD) (**illustration 23A et tableau 8**).

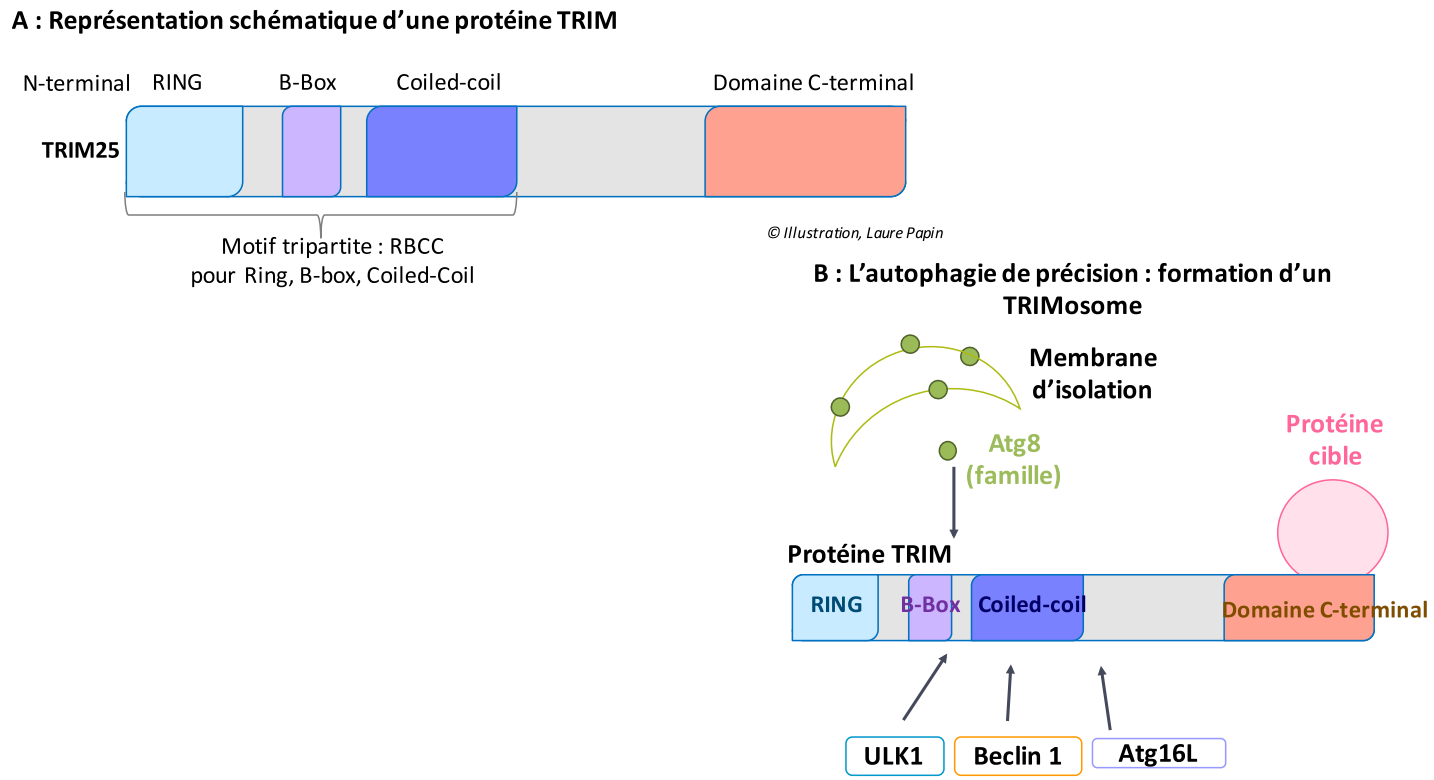


Illustration 23 - A : Représentation schématique d'une protéine TRIM, B : L'autophagie de précision : formation d'un TRIMosome

Domaine		Fonction / rôle
Motif RBCC caractéristique de la famille TRIM	RING	Si existant, domaine E3 ligase responsable de l'activité ubiquitine ligase, domaine de liaison avec l'E2 de conjugaison,
	B-Box (1 ou 2)	Domaine d'interaction protéine-protéine (doigt de zinc)
	Coiled-coil	Domaine de multimérisation permettant des associations homotypiques ou hétéromériques
	C-Terminal	Variable permet la liaison et la reconnaissance de la protéine cible. Il existe au moins 10 motifs différents retrouvés sur le domaine C-term en combinaisons ou seuls. Pour ne citer que les plus retrouvés : Cox-box ou SPRY et PRY

Tableau 8 - Domaines composants les TRIM et leurs fonctions

Tout d'abord, l'équipe du Docteur Deretic *et coll.,* a réalisé un criblage par petits ARN interférants couplé à de l'imagerie haut débit (Cellomics), l'impact de l'extinction d'un membre de la famille TRIM sur l'autophagie est visualisé à l'aide du tandem mRFP-GFP-LC3B [249]. Ainsi cette étude a révélé qu'un grand nombre (21 sur 67 testées) de protéines TRIM affecte l'autophagie. Ils montrent d'une part par analyse *in silico* de recherche de motifs putatifs LIR, que les **protéines TRIM peuvent exprimer des motifs LIR** leur donnant la possibilité d'interagir avec les protéines de la famille Atg8, par exemple TRIM5 en exprime deux alors que TRIM20 en exprime trois. Ainsi, TRIM5 semble particulièrement interagir avec GABARAP comme les autres protéines TRIM testées. D'autre part, les protéines TRIM (5α, 6, 17,22, 49) impactant l'autophagie semblent toutes **interagir telles des plateformes** avec ULK1, Beclin-1, p62 et les protéines de la famille Atg8 (sauf LC3B) [249] (**illustration 23B**). L'assemblage de la machinerie autophagique (ULK1, Beclin-1 et Atg8s) directement sur la protéine TRIM a conduit les auteurs à proposer le concept de **TRIMosome** (**illustration 23B**). Le TRIMosome agirait comme une plate-forme pour focaliser l'autophagie sélective sur des cibles très spécifiques [249]. Cependant d'autres mécanismes et protéines autophagiques peuvent être mis en jeu étant donné que cette étude montre que TRIM55 affecte fortement l'autophagie sans pour autant se lier à ULK1 et Beclin-1 (il se lie néanmoins aux Atg8). De plus, les auteurs ont décrit le fait que TRIM5 interagit préférentiellement avec la forme active d'ULK1 (phospho-ULK1 p-SER-317) et sachant que l'activité de Beclin-1 est directement régulée via la phosphorylation d'ULK1, les auteurs ont considéré que certaines protéines TRIM pouvaient agir comme des plateformes d'accueil pour l'activation d'ULK1 puis Beclin-1 (**illustration 23B**). La surexpression de certaines protéines TRIM semble promouvoir l'activation de Beclin-1 résultant en la dissociation de ce dernier avec Bcl-2 et agissant ainsi par voie de conséquence sur la régulation de l'autophagie basale.

Concernant **TRIM5α**, il a déjà été montré que TRIM5α Rhésus (RhTRIM5α) se lie à la capside du VIH-1 via son domaine SPRY agissant ainsi comme un puissant facteur de restriction viral inter-espèce [243]. TRIM5α pourrait aussi agir tel un PRR via la reconnaissance de la capside virale promouvant ainsi les réponses immunes innées antivirales [244]. De plus, l'activité ubiquitine ligase de RhTRIM5α (exercée par son domaine RING) semble nécessaire pour la décapsidation virale [245,246] suggérant que RhTRIM5α pourrait utiliser le protéasome pour la dégradation du VIH-1 [247,248]. L'étude de l'équipe du Docteur Deretic *et coll.,* a permis de montrer que RhTRIM5α peut cibler la capside du VIH-1 vers la voie autophagique en interagissant avec la famille des protéines Atg8. La reconnaissance capside-RhTRIM5α s'effectue au niveau du motif C-terminal SPRY [243,377] et la reconnaissance Atg8- RhTRIM5α via le motif coiled-coil grâce à deux motifs LIR putatifs déterminé par analyse *in silico* [249]. Cependant, un autre groupe propose que l'autophagie jouerait uniquement un rôle dans le renouvellement du niveau basal de TRIM5α, puisque l'inhibition de l'autophagie (par siRNA ou CRISPR-Cas9) ne semble

pas affecter la restriction du MLV (Virus de la Leucémie murin) par TRIM5α humain (HuTRIM5α) ou encore du VIH-1 par RhTRIM5α bien que l'expression de ces TRIM5α soit régulée conjointement par l'autophagie et le protéasome [250]. Enfin, une étude récente montre nous seulement que TRIM5α humain pourrait exercer un effet antiviral dans les cellules de Langerhans mais qu'en plus l'engagement de la langerine par le VIH-1 induirait le recrutement de HuTRIM5α via la protéine LSP1 formant ainsi un complexe avec Atg16L1 et Atg5 afin qu'il soit dégradé par autophagie [131]. Par ailleurs, il a été décrit que dans une étude d'analyse de la régulation transcriptomique de TRIM5α, TRIM22 et MxA (facteur de restriction de la réplication du virus de la grippe induit par l'interféron de type I) lors de l'infection par le VIH-1 que l'extinction (siRNA) de TRIM5α et TRIM22 augmente l'infection des LT $CD4^+$ par le VIH-1 [378]. Aussi, TRIM22 a été montré comme capable d'inhiber la transcription du VIH-1 indépendamment de son activité d'ubiquitine E3 ligase, de la protéine virale Tat et de la réponse NF-κB dépendante aux LTR montrant encore une fois l'importance de la participation cette famille protéique lors de l'infection par le VIH-1 [379].

Par la suite le groupe du Docteur Deretic *et coll.* a montré que TRIM20 et TRIM21 sont impliquées respectivement dans la dégradation de composants de l'inflammasome (NLRP1 et 3, les protéines pyrin-domain-containing 1 and 3, et la pro–caspase 1) et du système interféron de type I (IRF3) [254]. Comme précédemment, ces protéines TRIM forment une plateforme accueillant d'une part la protéine cible par liaison protéique directe et d'autre part des protéines autophagiques impliquées dans l'initiation (ULK1 et Beclin-1), dans l'élongation (Atg16L1) mais aussi dans l'exécution autophagique (membre de la famille Atg8) [254]. Toutefois, la diminution d'expression de TRIM17 (par siRNA) peut au contraire augmenter le nombre d'autophagosomes dans la cellule [249] et inhiber l'autophagie sélective (p62 et RhTRIM5α) [380] soulignant ainsi le rôle pro et anti autophagique des protéines TRIM. Enfin, de façon très intéressante, TRIM16 est capable de former un TRIMosome avec un membre de la famille des galectines, galectine 3, qui est un senseur impliqué dans la reconnaissance d'altération endomembranaires [79,80]. Cela ouvre la possibilité d'une potentielle implication des signaux « eat-me » ubiquitine et galectine (**illustration 23B**) dans la reconnaissance des cibles par les protéines TRIM élargissant ainsi le panel de protéines ciblées et dégradées par autophagie de précision.

D'autres groupes ont aussi montré un lien entre certaines protéines TRIM et l'autophagie (**tableau 9**). Par exemple, il a été décrit que la surexpression de TRIM13 peut induire l'autophagie [381] ou encore que TRIM28 (aussi appelé KRAB-ZFP-associated protein 1 (KAP1)) peut réguler l'autophagie [382]. TRIM19 (PML) et TRIM63 semblent aussi lier LC3 [253,383,384].

Pour conclure, les protéines TRIM représentent une nouvelle famille de RA qui semble reconnaître les cibles directement ou indirectement (galectine). Suite à cette reconnaissance, différentes protéines autophagiques viennent s'assembler directement sur la protéine TRIM qui sert de plateforme permettant ainsi la dégradation autophagique ou, plus rarement, son inhibition. Certains membres peuvent lier des protéines de la famille Atg8 et/ou d'autres SLR comme p62. Étant donné que la découverte de la capacité des protéines TRIM à agir en tant que RA est récente, les mécanismes impliqués restent encore à être étudiés, notamment le rôle de l'activité E3 ligase de certaines protéines TRIM dans l'autophagie, ou encore les différentes cibles reconnues. Cela ouvre la voie vers de nouveaux champs d'actions thérapeutiques ciblés et pour la compréhension de la dégradation sélective chez les mammifères. Le **tableau 9** récapitule les interactions connues à l'heure actuelle entre les protéines TRIM et certaines protéines Atg.

TRIM	Protéines autophagiques interagissant avec les TRIM
TRIM5	ULK1, Beclin 1, ATG14L1, AMBRA, p62, LC3A/C, GABARAP, GABARAPL1/2 (Mandell et al., 2014). TRIM5 est dégradé par autophagie.
TRIM6	ULK1, Beclin 1 (Mandell et al., 2014).
TRIM13	p62 (Tomar et al., 2012).
TRIM16	GABARAP (Mandell et al., 2014).
TRIM17	ULK1, Beclin 1, p62, LC3A, GABARAP (Mandell et al., 2014).
TRIM19 (PML)	LC3B (He et al., 2014). p62 (RAR alpha fusion protein) (Wang, Z. et al., 2014). Colocalise avec p62 (Pankiv et al., 2010).
TRIM20	ULK1, Beclin 1, ATG16L1, LC3A, LC3C, GABARAP, GABARAPL1/2 (Mandell et al., 2014; Kimura et al., 2015). Dégrade des composants de l'inflammasome (NLRP3, NLRP1 and pro-caspase 1) et supprime l'activation de l'IL-1β par dégradation autophagique (Kimura et al., 2015). TRIM20 est dégradé par autophagie en présence de sa cible.
TRIM21	ULK1, Beclin 1, p62, LC3A/C, GABARAP, GABARAPL1/2, ATG2A/3/4B/4C/5/10/ 12/13/16L1/101, AMPK, FIP200, VPS34, UVRAG, and WIPI2 (Behrends et al., 2010; Kimura et al., 2015). Colocalise avec LC3B (Niida et al., 2010).
TRIM22	ULK1, Beclin 1, p62, LC3A, GABARAP (Mandell et al., 2014). La sur-expression de TRIM17 supprime l'inhibition de l'autophagie (Mandell et al., 2014).
TRIM28	ATG5/10/13, p62, GABARAP, ULK1, UVRAG, WIPI2 (Behrends et al., 2010). VPS34 (Yang et al., 2013).
TRIM30	TRIM30 est dégradé par autophagie.
TRIM49	ULK1, Beclin 1, p62, LC3A, and GABARAP (Mandell et al., 2014).
TRIM50	p62 et TRIM50 est dégradé par autophagie (Fusco et al., 2012).
TRIM55	p62 (Lange et al., 2005; Pizon et al., 2013), NBR1 (Lange et al., 2005), LC3B (Pizon et al., 2013), LC3A, GABARAP (Mandell et al., 2014). TRIM55 est dégradé par autophagie.
TRIM76	Optineurin (Blandin et al., 2013).

Tableau 9 - Résumé des interactions TRIM - protéines autophagiques

11. L'AUTOPHAGIE ANTI-INFECTIEUSE : LA XENOPHAGIE

Il est maintenant clair que l'autophagie est un mécanisme anti-infectieux et il a été démontré que la xénophagie pouvait intervenir dans la clairance de bactéries, de virus, de champignons et de parasites. Ainsi, l'autophagie peut être directement induite par certains PRR agissant ainsi comme un effecteur de la réponse immunitaire innée. Etant une voie de dégradation, l'autophagie peut aussi fournir des antigènes pour la présentation antigénique afin de promouvoir l'immunité adaptative. L'autophagie

anti-infectieuse peut correspondre à la séquestration de pathogènes entiers ou de composants infectieux, faisant le plus souvent intervenir l'autophagie sélective via ses récepteurs et adaptateurs autophagiques. Néanmoins, les pathogènes semblent avoir réussi à s'adapter aux défenses cellulaires et ont développé des stratégies d'échappement. L'autophagie semble pouvoir contrôler l'efficacité et l'amplitude de la réponse cellulaire après reconnaissance d'un pathogène ou d'un signal exogène par des PRR.

11.1. L'autophagie induite par des récepteurs de reconnaissance de pathogènes (PRR)

11.1.1. Les TLR

L'engagement de certains TLRs par leur substrat peut induire l'autophagie. La reconnaissance du LPS par le **TLR-4** induit l'autophagie dans des lignées de macrophages murines [385]. Lors de l'activation des TLR-**3, 4, 7**, MyD88 et TRIF (TIR domain containing adapter inducing interferon ß) permettent le recrutement par ubiquitinylation de Beclin-1 dépendante de TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) ce qui le libère de son interaction avec Bcl-2 induisant ainsi l'autophagie [386,387]. TRAF6 peut aussi activer ULK1 contrôlant ainsi l'autophagie [306]. Par ailleurs, l'activation de **TLR-8** notamment par l'ARN sb du VIH-1 induit l'autophagie dans les macrophages par un mécanisme dépendant de la vitamine D et du CAMP (peptide humain antimicrobien cathelicidine) et l'induction de l'autophagie par les agonistes de TLR8 inhibent l'infection par le VIH-1 [388]. Une étude réalisée dans une lignée de macrophages montre que l'induction de l'autophagie via la signalisation **TLR-7** dépend de MyD88 et nécessite Beclin-1. En outre, l'activation de l'autophagie par les agonistes TLR-7 induit la destruction de mycobactéries, bien que les mycobactéries ne soient normalement pas associées à la signalisation issue de ce PRR. Cette capacité d'élimination des agents pathogènes est fortement compromise dans des cellules dont l'expression de Beclin-1 a été diminuée par siRNA suggérant donc un processus autophagie-médié [389]. De plus, l'autophagie est essentielle pour la production de l'IFN-alpha par les pDC durant une infection par le VIH-1 et la signalisation par **TLR-7** régule ce processus [390].

Enfin, nous verrons dans le chapitre D.12 que le VIH-1 inhibe l'autophagie dans les DC. L'inhibition de l'autophagie induit une diminution de l'activation des cDC (CD11c+) et des MDDC dépendante des TLR-4 (LPS) et TRL8 (ARN sb) et des réponses antimicrobiennes associées [158]. Cela indique donc que l'autophagie via les amphisomes contribue à fournir des composants microbiens pour l'induction de la réponse immunitaire [391].

11.1.2. Les NLR

Les senseurs cytosoliques NOD1 et NOD2 reconnaissent le muramylpeptide composant notamment le peptidoglycane bactérien (bactéries Gram négatives) et cela induit leur activation ainsi que le recrutement de la protéine autophagique Atg16L1 à la membrane plasmique, le lieu d'entrée bactérienne [392]. Cela est cohérent avec le rôle d'Atg16L1 en tant que cargo de membrane au phagophore à partir de la membrane plasmique décrit précédemment dans le chapitre D.9.1.3.5 [330]. Concrètement, en condition pathologique (maladie de Crohn) dans les cellules dendritiques, suite à la reconnaissance de bactéries commensales comme *Escherichia coli*, ou pathogènes opportunistes comme les bactéries du genre Salmonella et Shigella, NOD2 est capable d'activer l'autophagie, impliquant notamment les protéines autophagiques Atg5, Atg7, Atg16L1, induisant ainsi la dégradation des bactéries détectées par xénophagie. Cette autophagie NOD2 médiée est nécessaire pour la mise en place et la génération de la réponse CMH-II pour présenter des antigènes issus de la dégradation bactérienne aux LT CD4+ [72]. Le polymorphisme d'Atg16L1 et NOD2 est associé à un risque plus élevé de développer la maladie de Crohn, tant ce mécanisme est important pour la tolérance de la flore commensale [393].

11.1.3. Les RLR

A l'heure actuelle aucune étude n'a démontré un lien direct d'induction d'autophagie par un RLR dans un contexte infectieux. En revanche, l'autophagie peut réguler la réponse antivirale induite par l'activation de certains RLR. En effet, dans le cadre de l'infection par le VSV (virus à ARN sb), le conjugué Atg5-Atg12, très important pour l'élongation du phagophore, a été montré comme régulant négativement la voie de production de l'IFN de type I par association directe avec RIG-I et le promoteur de l'IFN IPS-1 [394]. Ainsi, certains composants de la machine autophagique semblent bloquer les réponses immunitaires antivirales innées, contribuant ainsi à la réplication du virus à l'ARN dans les cellules hôtes. Par ailleurs, en absence d'autophagie (cellules Atg5-/-), les mitochondries défectueuses ne sont plus recyclées et s'accumulent dans les cellules, générant une production de ROS (reactive species oxygen) associée aux mitochondries. Ces données indiquent ensuite que les ROS associés aux mitochondries jouent un rôle clé dans la potentialisation de la signalisation RLR [395].

11.1.4. Les CLR

Seule une étude très récente démontre un possible lien entre un CLR et la voie autophagique. En effet, il semble que l'engagement de la langerine (sur des LC primaires ou exprimée dans des lignées myéloides MUTZ et de glioblastome U87) par le VIH-1 induirait une signalisation permettant au Trim5α

humain d'engager une voie de dégradation via l'autophagie [131]. Par ailleurs, des liens indirects ont montrés l'implication des CLR et de la voie autophagique dans un contexte infectieux. En effet, lors de l'infection des DC par la bactérie *Porphymonas gingivalis* le croisement des voies TLR-2 (reconnaissant FimA, une protéine structurelle du fimbriae bactérien) et de DC-SIGN (reconnaissant Mfa-1 une glycoprotéine du fimbriae bactérien) empêche la destruction par autophagie de la bactérie [396]. Les voies de signalisation engendrées par les récepteurs DC-SIGN-TLR-2 déterminent le devenir intracellulaire de ce pathogène dans les cellules dendritiques et peut influencer la persistance de la bactérie dans les DC. Enfin, le CLR Dectin-1 (connu pour sa capacité de reconnaissance de glycans fongiques) peut induire la LAP dans les macrophages et les MDDC en recrutant directement LC3 aux phagosomes [397]. Cela requiert l'implication de la tyrosine kinase Syk, d'Atg5 et l'activation de la production de ROS par la NADPH oxydase.

11.2. La xénophagie anti-bactérienne

C'est grâce à l'étude de l'autophagie au cours de l'infection bactérienne que la xénophagie a été décrite [398,399]. Les **Mycobactéries** entrent dans les macrophages par phagocytose et en condition de carence nutritive (ou après traitement avec de la rapamycine) l'autophagie contrôle la réplication de plusieurs espèces de ce genre bactérien tels que *M. tuberculosis* et le BCG (Bacillus Calmette-Guérin une souche atténuée de *M. bovis* [398]. Néanmoins, ces bactéries réussissent à échapper à la dégradation en inhibant la maturation des phagosomes et des lysosomes [400].

Concernant les **coques à Gram positif**, les bactéries du genre Streptococcus entrent dans la cellule par endocytose et échappent à leur dégradation en sécrétant une toxine la streptolysine O permettant d'endommager les membranes endosomales. Une fois dans le cytoplasme, les Streptocoques du groupe A pouvent être dégradés de façon Atg5 dépendante (dans les cellules MEF, des fibroblastes) [399]. De façon similaire, d'autres coques à Gram positif, les Staphylocoques et notamment l'espèce *S. aureus*, responsable de graves infections nosocomiales et opportunistes, se retrouvent piégés dans des vésicules WIPI-1 positives ciblées pour la dégradation lysosomale dans des cellules U2OS (cellules d'ostéosarcome) [401].

Enfin concernant les **bacilles à Gram négatif**, la plupart sont des entérobactéries faisant parti de la flore commensale mais pouvant parfois s'avérer être des pathogènes opportunistes dans certains contextes. De nombreuses études démontrent l'importance de la xénophagie antibactérienne en tant que mécanisme de défense innée comme par exemple le fait que l'autophagie semble contrôler la réplication des bactéries de l'espèce *Escherichia coli* [402]. Les bactéries du genre Salmonella peuvent se retrouver dans des vacuoles (SCV vacuoles contenant Salmonella) et s'en échapper via leur système de sécrétion. Une fois dans le cytoplasme, les bactéries peuvent être ubiquitinylées (via l'E3 ubiquitine ligase LRSAM1) et les dommages provoqués aux membranes peuvent être reconnus par la galectine 8

[80,403]. Ces signaux « eat-me », l'ubiquitine recouvrant les bactéries et la galectine 8 sur les membranes endommagées, vont pouvoir être reconnus par p62, l'OPTN ou NPD52 [80,403] et ciblés de manière spécifique vers une dégradation lysosomale. L'espèce *Shigella flexneri* a aussi été montrée comme étant dégradée via une autophagie sélective médiée par p62 et NDP52 [80,404] mais aussi par dégradation directe sans SLR par xénophagie via l'expression de VirG une protéine de surface bactérienne reconnue par Atg5 [405]. Enfin, au contraire, certaines espèces de bacilles à Gram positif utilisent l'autophagie pour mieux persister dans la cellule infectée. C'est le cas de la bactérie *Coxiella burnetii* qui induit l'autophagie afin de former des vésicules propices à sa réplication [406]. L'augmentation du flux autophagique (par carence nutritive) ou d'autophagosome (traitement rapamycine) promeut d'autant plus la réplication bactérienne [406,407] notamment en réparant et en maintenant l'intégrité du compartiment vacuolaire dans lequel cette espèce bactérienne se réplique [408].

En conclusion, bien que la xénophagie (sélective ou non) semble être un mécanisme antibactérien efficace, certaines de ces études montrent que les bactéries s'adaptent à leur environnement et développent des moyens élaborés afin de se protéger et persister dans l'organisme.

11.3. La virophagie

Avant de détailler les rôles de l'autophagie au cours de l'infection par le VIH-1, nous verrons dans ce paragraphe qu'encore une fois, comme pour les bactéries, l'autophagie (sélective ou non) peut participer à la dégradation de composants viraux (virophagie). Dans la plupart des cas les virus peuvent détourner l'autophagie ou encore l'inhiber pour échapper à la dégradation lysosomale. L'effet protecteur antiviral de l'autophagie intervient très rapidement après l'infection [409]. En effet, des autophagosomes peuvent être formés dans la cellule en 5-10 minutes en condition de carence nutritive (acides aminés), encore une preuve qui tend vers le fait que l'autophagie peut être considéré comme un mécanisme de réponse innée [309].

11.3.1. Virophagie par autophagie sélective

La protéine de la capside du virus Sindbis (ARN sb), est reconnue par p62 conduisant à sa dégradation par autophagie sélective [410]. De façon intéressante, il a été décrit que le domaine UBA de p62 n'était pas nécessaire pour cette interaction, suggérant que l'interaction soit indépendante de l'ubiquitinylation et le mécanisme impliqué reste encore à être élucidé. La dégradation de la capside virale permet de détoxifier la cellule de l'accumulation de capside virale et ainsi contribue à maintenir la cellule en vie. De façon similaire, la capside du virus du Chikungunya (CHIKV) (ARN sb) peut aussi être reconnue par le SLR p62 mais cette fois ci de manière dépendante de l'ubiquitinylation de la capside. L'induction d'autophagie après infection par le CHIKV avait été rapportée et corrélait avec une résistance des cellules infectées à la mort cellulaire et une restriction de la transmission d'infection

plaçant l'autophagie dans un rôle cytoprotecteur [411]. En fait, il semble que le RA p62 protège les cellules de la mort en ciblant la capside ubiquitinylée vers les autophagolysosomes [412]. En revanche, NDP52, interagit avec la protéine virale non structurale nsP2, favorisant ainsi la réplication virale. Ces résultats décrivent les rôles distincts et contradictoires de p62 et NDP52 au cours de l'infection virale [412]. Toutefois, il a aussi été montré que certaines espèces virales se sont adaptées à la sélectivité du mécanisme d'autophagie et peuvent directement induire la dégradation de certains SLR. En effet, lors de l'infection par le virus de la Dengue (DENV), le RA p62 restreint la réplication du DENV et est spécifiquement dégradé dans les cellules infectées par le DENV grâce à une augmentation de la dégradation protéasomique [413].

11.3.2. Inhibition des étapes initiales de virophagie

En outre, plusieurs étapes de l'autophagie peuvent être prises pour cible par les virus. Par exemple, certains virus induisent l'autophagie dès leur entrée, comme le virus de la rougeole (MeV) qui induit l'autophagie par liaison à son récepteur d'entrée dans la cellule, le récepteur CD46 [414]. Durant les stades tardifs de l'infection, l'expression de la protéine C du MeV est suffisante pour induire une deuxième vague d'autophagie par interaction avec IRGM (Immunity-related GTPase family M protein), un régulateur connu de l'autophagie [415]. En revanche, certains autres virus, comme le HSV-1 *(Herpès Simplex Virus Type 1*), peuvent bloquer les étapes d'initiation de l'autophagie. En effet, le HSV-1 peut inhiber l'autophagie grâce à deux protéines virales, ICP34.5 qui va interagir avec Beclin-1 et Us11 qui va s'associer à la protéine cellulaire antivirale PKR et inhiber l'autophagie par un mécanisme encore inconnu [416].

11.3.3. Inhibition des étapes tardives de l'autophagie

Concernant les étapes de maturation de l'autophagie, de nombreux virus à ARN, comme les Picornavirus (*Poliovirus, Rhinovirus*) et les Flavivirus (par exemple le virus de l'Hépatite C (HCV)), induisent le processus autophagique au cours de leur cycle réplicatif pour générer des membranes nécessaires à la biogenèse de leurs composants viraux [417]. Par exemple, le HCV utilise des vésicules LC3-PE positives pour sa réplication [418]. Une espèce de la famille des Picornavirus, le virus *Coxsackievirus B*, peut même utiliser des vésicules autophagiques matures pour sortir des cellules et se propager aux cellules voisines [419]. De nombreux virus peuvent ainsi détourner les étapes tardives de la machinerie autophagique pour leurs propres bénéfices comme le virus de la grippe A [420] ou encore le VIH-1 (voir le chapitre ci-après).

12. La virophagie anti-VIH-1

Dans le cadre de ce projet je me suis plus précisément intéressée aux mécanismes impliquant l'autophagie au cours des évènements précoces de l'infection par le VIH-1. Il a été décrit par mon équipe d'accueil et d'autres groupes que l'autophagie pouvait jouer un rôle pro et antiviral selon la chronologie de l'infection, le type cellulaire ciblé ainsi que son statut (infecté ou non). Ainsi au cours de ma thèse j'ai eu l'opportunité de participer à l'élaboration d'un chapitre de livre relatant cette thématique, que vous trouverez ci-après en annexes. Voici la référence de cette revue : **Papin L.**, et al., Autophagy and HIV-1 Infection, *Encyclopedia of AIDS*, 2015. **L'illustration 24**, provenant de cet article, illustre la relation entre l'autophagie et le VIH-1 dans les LT CD4+, les macrophages et les cellules dendritiques.

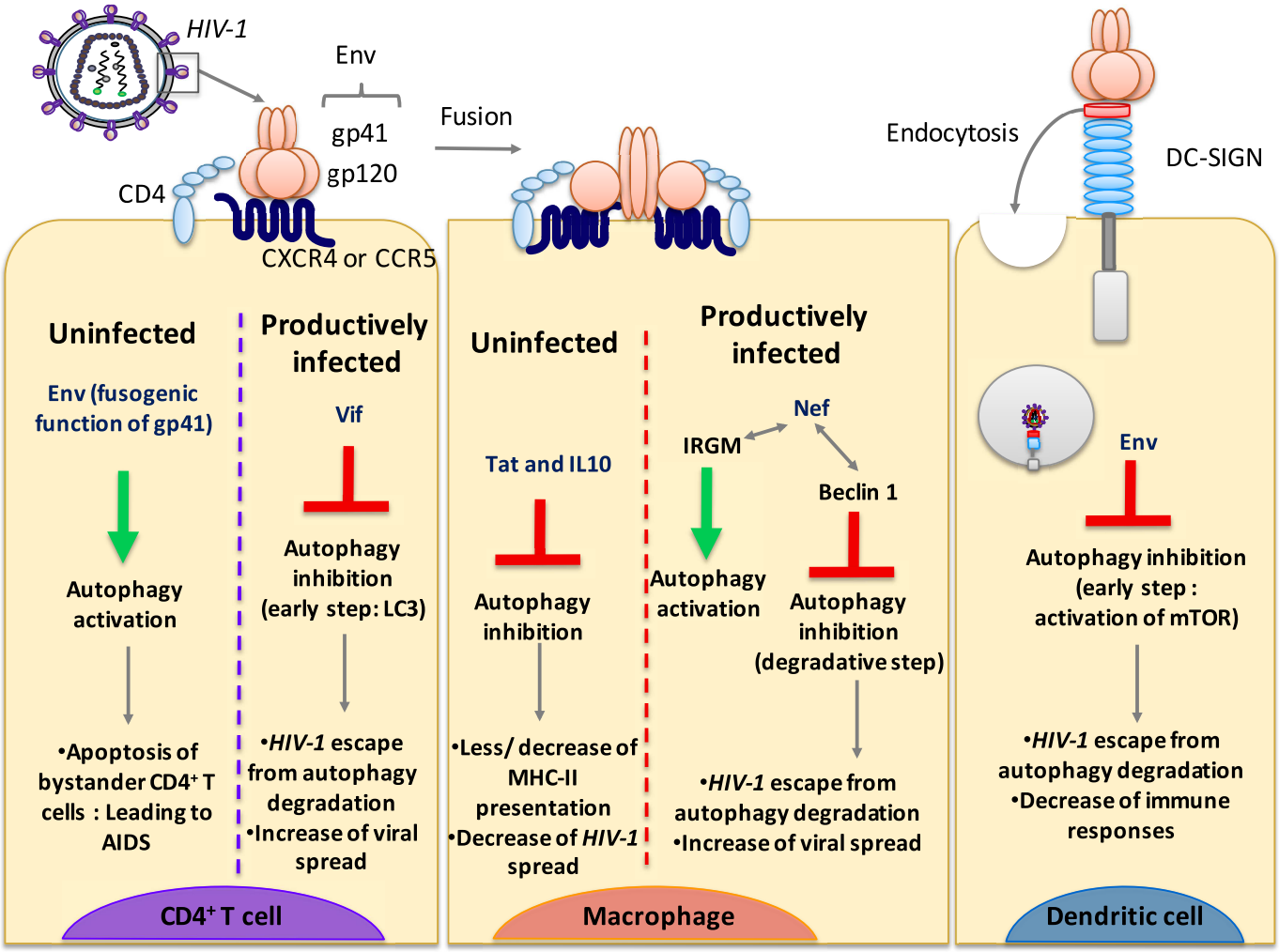


Illustration 24 - Relation VIH / autophagie par type cellulaire

12.1. Les lymphocytes T CD4$^+$

Les lymphocytes T CD4$^+$ sont les cibles principales du VIH-1. Durant la phase asymptomatique de la maladie, une diminution progressive du nombre de lymphocytes T CD4$^+$ chez les patients infectés est observée menant à la phase SIDA caractérisée par une immunodéficience. Cette déplétion est multifactorielle et est toujours à l'heure actuelle le sujet de nombreuses études. Néanmoins, plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette déplétion comme l'apoptose, la pyroptose ou encore l'inflammation chronique (chapitre A.1.4) [8].

• Une fois infectés, les LT CD4$^+$, expriment à leurs surfaces la glycoprotéine d'enveloppe virale (Env). De façon très intéressante, le contact entre cellules infectées ou exprimant l'enveloppe virale Env et des cellules non infectées exprimant les récepteurs CD4 et CXCR4/CCR5 induit la **mort par apoptose via la voie autophagie des cellules non infectées avoisinantes** [12]. En effet, ce contact Env-CD4/corécepteur, induit une accumulation de caspase 3 et de vacuoles autophagiques. Plus précisément que lors de ces contacts cellulaires, les propriétés fusogéniques de la gp41 sont requise pour générer des syncytia et l'induction de la mort cellulaire par autophagie des cellules non-infectées [421]. Ainsi, par l'induction de la mort programmée par autophagie des LT CD4$^+$ non infectés, le VIH-1 est capable de détourner les propriétés antivirales de ce mécanisme cellulaire (**illustration 24**).

•Toutefois, les **LT CD4$^+$ productivement infectés** (souches R5 ou X4) présentent une réduction significative du flux autophagique, du nombre d'autophagosomes ou encore la diminution de certaines protéines cruciales pour l'autophagie telles que Beclin-1 et LC3-II [422,423]. Récemment, une autre étude montre que l'autophagie est rapidement induite (dès 4H) dans les cellules HEK exprimant stablement CD4 et CXCR4 et les LT CD4$^+$ en présence de cellules exprimant Env. Cette induction d'autophagie est progressivement et rapidement bloquée mais les mécanismes sous-jacents expliquant cette inhibition ne sont pas encore élucidés. Néanmoins, la protéine virale Vif interagissant avec la forme pro-LC3B est en partie responsable de l'inhibition de l'autophagie au niveau des étapes d'initiation [424] (**illustration 24**). De plus, il a très récemment été montré que le trans-activateur viral Tat du VIH-1 est dégradé par autophagie sélective dans les LT CD4$^+$ [425]. La protéine virale Tat qui est importante pour la transcription du génome viral, va être spécifiquement reconnue par le SLR p62 qui va induire sa dégradation lysosomale par autophagie sélective. Cette interaction est indépendante de l'ubiquitine car le domaine UBA de p62 n'est pas requis pour l'interaction entre p62 et Tat. Le VIH-1 inhibe ainsi l'autophagie de façon à éviter sa dégradation ainsi que la dégradation de composants viraux nécessaires à sa réplication et à la génération de nouveaux virions comme la protéine Tat ou encore la capside virale [131,425,426].

Pour conclure, outre son rôle antiviral, l'autophagie peut également être utilisée par le virus pour son propre profit pour se reproduire plus efficacement dans les LT $CD4^+$ ou pour contrôler la survie cellulaire. Le mécanisme expliquant cette dichotomie (**illustration 24**) dans le processus autophagique entre cellules LT $CD4^+$ productivement infectées et les lymphocytes bystander est actuellement en cours d'étude dans le laboratoire d'accueil.

12.2. Les monocytes et macrophages

Dans le cas des LT $CD4^+$ le VIH-1 semble inhiber ou utiliser le mécanisme d'autophagie pour se propager et accroitre l'immunodéficience chez les patients infectés (**illustration 24**). En revanche, il semble que chez les macrophages et les monocytes, autre population cible du VIH-1, le contact de cellules exprimant l'enveloppe virale n'induit pas la mort par autophagie des cellules voisines non infectées mais induit l'accumulation de vacuole autophagiques [422]. Au contraire des LT $CD4^+$, l'infection productive (R5 et X4) chez les macrophages et les monocytes semble induire l'autophagie [422]. Les étapes d'initiation de l'autophagie paraissent favoriser la production de particules virales en contribuant au clivage du précurseur polyprotéique gag qui a été retrouvé associé à LC3 et présent dans des membranes enrichies en LC3-II [427]. Bien que le VIH-1 semble exploiter l'autophagie durant les premières étapes de l'infection chez les macrophages pour la néosynthèse virale, le virus a un impact négatif sur les étapes de maturation de l'autophagie, notamment pour éviter sa dégradation. En effet, la protéine Tat induit la production d'IL10 par les macrophages activant ainsi la voie STAT3. La protéine virale Tat peut aussi s'associer, entre autres, au corécepteur CXCR4 induisant l'activation de la voie AKT/Src. L'activation de ces voies induit *in fine* l'inhibition de l'autophagie et conduit à une diminution de la présentation CMH-II [428]. De plus, il a été décrit qu'une autre protéine virale, Nef, interagit avec IRGM qui joue un rôle dans l'immunité innée et dans la régulation de l'autophagie en interagissant avec ULK1 et Belin1 mais aussi NOD2 et Atg16L1 dans un contexte d'infection bactérienne [429]. L'interaction Nef/IRGM induit l'accumulation d'autophagomes et favorise la réplication du VIH-1 [415]. Le stade de maturation des vacuoles autophagiques est aussi inhibé par une autre action de la protéine Nef capable de s'associer avec Beclin-1 [427] (**illustration 24**).

Pour conclure, il apparaît que l'infection des macrophages et monocytes par le VIH-1 est détectée uniquement chez les cellules présentant une faible activité du flux autophagique. Ceci renforce l'idée que l'autophagie exerce une fonction antivirale dans les macrophages mais on ne sait pas encore si le virus cible spécifiquement cette machinerie dans ces cellules afin de contrer cette fonction.

12.3. Les cellules dendritiques

Enfin, en ce qui concerne les DC, le laboratoire d'accueil a montré que le contact avec l'enveloppe virale du VIH-1 provoque très rapidement, chez les DC infectés, l'activation de la kinase mTOR (via la voie ErK/pS6) qui est un régulateur négatif de l'étape d'initiation du flux autophagique (**illustration**

24). La voie mTOR est activée en présence de gp120, du VIH-1 ou d'anticorps anti-CD4 ou encore le mutant du VIH-1 défectif pour la fusion F522Y (mais pas d'anticorps anti-DC-SIGN ou de virus ΔEnv délété pour l'enveloppe virale) ce qui signifie que cette voie d'inhibition autophagique repose sur l'interaction de l'enveloppe virale Env indépendamment de ses propriétés fusogéniques et du récepteur CD4.

Concrètement, cela entraine une diminution significative et progressive du nombre d'autophagosomes dans les cellules infectées réduisant ainsi l'activité virophagique dans ces cellules et favorisant l'infection virale au cours du temps [158]. L'inhibition de l'autophagie induite par le VIH-1, non seulement favorise l'infection et la transmission du virus vers les cellules cibles (la *trans*-infection), mais altère aussi fortement les réponses immunitaires innées et adaptatives des DC. Ceci a d'ailleurs été confirmé par d'autres groupes de recherche [430]. A l'inverse, lorsque l'autophagie est induite (en inhibant mTOR avec de la rapamycine, le VIH-1 ou encore des siAtg5 ou siLC3), on peut observer une réduction significative de la quantité de virus et du transfert de l'infection par le VIH-1 aux cellules T $CD4^+$ cibles [158] (**illustration 24**). De même, l'inhibition de la voie autophagique diminue les réponses TLR-4 et LTR8 (via leurs ligands respectifs le LPS et l'ARN sb) illustré par la diminution de la production de TNF alpha. Aussi, lorsque l'autophagie est inhibée (par siRNA LC3 ou inhibition par 3-MA), il a été observé une diminution forte de l'activation de clones de LT $CD4^+$ spécifiques du VIH-1. La 3-MA bloque la PI3KC3 et donc inhibe l'étape de nucléation autophagique [324]. A contrario, l'induction d'autophagie dans les DC (par traitement avec rapamycine) entraine une meilleure réponse immunitaire innée et adaptative, suggérant que l'autophagie contribue fortement à la dégradation des virions et ouvrant la voie vers une exploitation possible dans le cadre de thérapies vaccinales ou pharmacologiques.

Le déclin autophagique apparaît après 10H d'exposition des DC au VIH-1 avec, comme pour les LT $CD4^+$, un pic d'autophagie (augmentation de LC3-II) observé aux temps précoces suggérant une réponse autophagique rapide. Les DC étant des phagocytes et des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, il a été observé que le VIH-1 est très rapidement conduit vers la dégradation lysosomale autophagique (virus dans des vésicules à doubles membranes en TEM). En effet **dès 15 minutes d'exposition** des DC au VIH-1 environ 10% de la protéine gag du VIH-1 sont retrouvés dans des vésicules $LC3^+$. Après 12H, on observe un pic de colocalisation entre gag et LC3 mais aussi de gag et LAMP1 marqueur des compartiments lysosomaux et d'autant plus en présence de chloroquine (un alcaliniseur de l'espace intra-lysosomal). Conformément aux travaux réalisés par d'autres groupe, le VIH-1 est fortement dégradé dans les DC après l'entrée virale [117,141]. De façon très intéressante, il est important de noter que l'anticorps anti-DC-SIGN (H-200) n'a pas montré d'effet sur l'activation de la voie mTOR, mais il a été constaté que DC-SIGN co-localise fortement avec des structures $LC3^+$ après 10 minutes de stimulation avec le VIH-1, la gp120 et l'anticorps anti-DC-SIGN AZN-D1. Cela sous-entend

peut-être un rôle mineur de l'engagement de DC-SIGN dans l'activation de mTOR (inhibition de l'autophagie) mais cela suggère, en outre, un lien potentiel entre le récepteur DC-SIGN et le trafic vers les autophagosomes. C'est justement ce lien que j'ai étudié durant ma thèse. Par ailleurs, un autre groupe a étudié le suivi de lentivirus pseudotypés avec une glycoprotéine d'enveloppe mutée du virus Sindbis lui conférant une exclusivité de fixation à DC-SIGN et mis en contact avec des HEK293T stablement transduites pour exprimer le récepteur DC-SIGN humain [431]. Cette étude a montré que ces lentivirus chimériques étaient internalisés par endocytose clathrine-dépendante par le récepteur DC-SIGN puis que ces virus étaient retrouvés dans des compartiments endosomaux précoces (co-localisation avec EEA-1) puis après 45-75 minutes dans des organelles autophagiques $LC3^{+}$. Le traitement des cellules avec de la rapamycine et de la 3-MA respectivement diminue et augmente significativement la quantité lentivirale dénombrée renforçant l'idée que l'autophagie agit en tant que processus de défense antivirale capable aussi de limiter la transduction de cellules [431]. Cela confirme aussi la probable implication de DC-SIGN dans le ciblage de virions vers une voie autophagique. Enfin, nous avons évoqué précédemment une étude récente montrant que l'engagement de la langerine par le VIH-1 pouvait induire un complexe avec (la capside virale)-Trim5α-Atg16L1-Atg5 afin d'acheminer le virus vers la dégradation [131]. Ce complexe formé est proche de ceux décrit lors de l'autophagie de précision caractérisée par les études du Docteur Deretic et impliquant le recrutement d'une protéine de la famille TRIM comme plateforme de protéines autophagiques [254,432].

En conclusion, le VIH-1 est capable de bloquer, à moyen terme, l'initiation de l'autophagie dans les DC suggérant fortement que le virus tente de contrecarrer l'autophagie en tant que mécanisme de défense antivirale [158]. Néanmoins, la voie autophagique apparaît comme un mécanisme antiviral intervenant très rapidement (peut-être même le premier d'ailleurs) lors de l'infection par le VIH-1 et il apparaît donc essentiel de mieux caractériser son mode de régulation. Ainsi, mieux caractériser les mécanismes conduisant à une autophagie antivirale dans les DC permettra sans nul doute d'identifier les facteurs cellulaires impliqués dans les évènements précoces de l'entrée virale, pouvant se révéler être des cibles de choix pour certaines thérapies visant à limiter les étapes ultérieures de transmission virale.

MATERIEL ET METHODES

1. CULTURE CELLULAIRE

1. Lignées cellulaires et transfection

Les lignées cellulaires HEK293T (Human Embryonic Kidney Cells exprimant l'antigène T du SV40) et HeLa (Henrietta Lacks Human Cervical cancer) ont été utilisées. Ces lignées cellulaires ont été cultivées dans du milieu de culture DMEM supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal ainsi que 1% d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine). Les lignées cellulaires THP-1 ATCC et THP-1 DC-SIGN (lignée myélomonocytique humaine) proviennent du programme AIDS reagent du NIH, les THP-1 DC-SIGN ont été transduites pour exprimer stablement le récepteur. Ces lignées cellulaires ont été cultivées dans du milieu de culture RPMI supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal ainsi que 1% d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine). Les cellules HEK293T ou HeLa ont été transfectées à l'aide de Turbofect Transfection Reagent (Thermo Scientific) ou JetPEI (Polyplus) en respectant les indications du fournisseur. Pour chaque type cellulaire, la quantité optimale de plasmide transfecté a été vérifiée par dose réponse en cytométrie en flux ou par western -blot. Le **tableau 10** récapitule les principaux plasmides utilisés durant ma thèse.

Plasmides	Laboratoire de provenance
pCDNA3_DC-SIGN_WT	Laboratoire du docteur Geijtenbeek
pCDNA3_DC-SIGN_LL/AA	
pCDNA3_DC-SIGN_EEE/AAA	
pCDNA3_DC-SIGN_Y/A	
pCDNA3_DC-SIGN_K5/A	Synthétisé durant ma thèse
pCDNA3_DC-SIGN_K32/A	
pmAtg9-HA	Docteur Sharon Tooze (Young et al., 2006)
TRIM25-V5	Docteur Sébastien Nisole
TRIM25-HA	Docteur Kwon Matthias W Hentze & V Narry Kim (Kwon et al., 2003
TRIM25-HA 1-630	
TRIM25-HA 1-185	
TRIM25-HA 81-630	
TRIM25-HA 185-630	
GST-vide	Laboratoire d'accueil (Borel et al. 2015)
GST-LC3A	
GST-LC3B	
GST-LC3C	

Tableau 10 – Liste de plasmides utilisés durant ma thèse

2. Isolation de monocytes à partir de PBMC humaines

Des cellules mononucléées (PBMC) de sang leuco-plaquettaire (Buffy coat) ont tout d'abord été purifiées sur gradient de Ficoll. Puis des monocytes ($CD14^+$) ont été isolés à partir de ces PBMC après

incubation avec des anticorps anti-CD14 couplés à des billes magnétiques (Milteniy Biotech) et passage à travers une colonne composée de sphères ferromagnétiques et soumise à un champ magnétique via un aimant. Les cellules $CD14^+$ ainsi retenues par le champ magnétique sont lavées dans la colonne avec un tampon adéquat (PBS + 0,5% d'albumine de sérum bovin + 2mM EDTA) puis éluées avec ce même tampon une fois éloignées du champ magnétique.

3. Génération et culture de MDDC

Les monocytes ainsi obtenus sont ensuite cultivés dans du milieu de culture IMDM complet en présence d'interleukine-4 (500 unités/ml) et de GM-CSF (500 unités/ml), ajoutés tous les 2-3 jours, pendant 5 à 7 jours permettant de générer des cellules dendritiques dérivées de monocytes (MDDC).
Etude de l'endocytose du récepteur DC-SIGN

4. Etude de l'endocytose du récepteur DC-SIGN

Une fois préparées sur lamelles pour l'IF ou plaque 96 puits pour le Facs et la biochimie, les cellules sont placées à 4°C pendant 10-15 minutes. Suivant les conditions indiquées, certains ligands spécifiques de DC-SIGN (Anticorps DCN46 et/ou MR1 à 5µg/ml final ; le VIH-1 X4 ou R5 MOI 2 à 5 selon les expérimentations ; lipoarabinomannan mannosylé (ManLAM) à 2µg/ml final) sont ajoutés aux cellules, homogénéisé et incubés à 4°C durant 10-15 minutes afin de figer les phénomènes de diffusion et d'endocytose. Afin d'étudier l'endocytose et l'internalisation du récepteur DC-SIGN, les cellules sont ensuite incubées à 37°C selon les temps de cinétique. Pour l'immunofluorescence ou le FACS les cellules ont été fixées en paraformaldéhyde (0.5% ou 2% si infection par le VIH-1) durant au moins 15 minutes. Pour les aspects biochimiques, les cellules ont été soit directement lysées dans du tampon Laemmli 2X pour les analyses directes par western blot ou dans du tampon de lyse pendant 20 minutes à 4°c pour les immunoprécipitations.

2. PRODUCTION DE VIRUS

La production des virus VIH-1 de tropisme X4 et R5 a été réalisée à partir de cellules HEK293T transfectées avec des plasmides contenant les provirus par la technique au phosphate de calcium. Les plasmides contenant les provirus utilisés sont les constructions suivantes : R8bal_HIV-1 (R5) et R9_HIV-1 (X4). Pour le dosage des virus produits, des cellules JLTR5 (NIH) (des Jurkat (LT CD4+) exprimant stablement le corécepteur R5 et naturellement X4 avec la GFP sous contrôle du promoteur LTR du VIH-1) ont été infectées par différentes dilutions des surnageants de virus obtenus précédemment. L'analyse du niveau infection via la détection de la fluorescence GFP est réalisée par cytométrie en flux et permet de corréler une multiplicité d'infection (MOI).

3. BIOCHIMIE

1. Western blot

Après récupération des cellules par centrifugation, le culot est directement lysé dans du tampon Laemmli 2X (composé notamment de β-mercaptoethanol) puis chauffé sur bloc chauffant durant 10 minutes à 95°C pour les expériences de western blot sur lysats cellulaires directs. Les échantillons dénaturés provenant de lysats directs ou des IP (voir après) sont déposés sur un gel Prosieve à 10%. Les protéines ayant migré dans le gel sont ensuite transférées par sur membrane de PVDF (polyfluorure de vinylidène) pré-activée avec de l'éthanol absolu ou de nitrocellulose. Après saturation de la membrane pendant 1h avec du tampon PBS/0,1%Tween-20 supplémenté de lait écrémé (5%), les anticorps primaires non-couplés dirigés contre la protéine d'intérêt sont dilués dans du tampon PBS/0,1% Tween-20/1% lait puis ajoutés sur la membrane toute la nuit à 4°C en agitation. Après 3 lavages de 10 min, la membrane est ensuite incubée pendant 1h à température ambiante dans une solution PBS/0,1% Tween-20/1% lait contenant une dilution d'anticorps secondaires dirigés contre l'espèce de l'Ac primaire et couplés à la peroxydase de radis noir (HRP). Après lavages, la réaction générant la chimioluminescence a été réalisée avec du Luminata ou Luminata forte (Merck Millipore) et la détection du signal est effectuée à l'aide de la GBox-iChemi assistée du logiciel GeneSys ou à l'aide du ChemiDoc (Biorad) assisté du logiciel Image Lab. La quantification par densitométrie a été mesurée à l'aide de ces mêmes logiciels.

2. Immunoprécipitation

Après traitement des cellules (transfection et/ou endocytose de DC-SIGN), les cellules ont été lysées durant 30 minutes à 4°C (sur glace) dans du tampon de lyse (20mM Tris/150mM NaCl/1%NP-40/inhibiteurs de protéases et de phosphatases) puis les lysats ont été centrifugés durant 30 minutes à 4°C à 13500 rpm. Des billes de sépharose couplées aux protéines A et G (Rockland), ont au préalable été lavées (centrifugations à 13500 rpm, 4°C, 1 min) 2 fois en tampon de base (20mM Tris/150mM NaCl) puis 1 fois en tampon de lyse. Dans le cadre d'une immunoprécipitation du récepteur DC-SIGN engagé au préalable par des anticorps, les lysats cellulaires ont directement été incubés sur les billes et placés sur roue à 4°C toute la nuit (12h max). Sinon, les billes lavées sont incubées en présence d'anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt en concentration saturante durant 2h sur roue à 4°C. Suite à cela les billes ont été de nouveau lavées pour rejeter l'excès d'anticorps. Enfin 10% des lysats cellulaires ont été récupérés et dénaturés en tampon Laemmli 2X et bouillis sur bloc chauffant durant 10 minutes à 93°C, constituant ainsi l'input. Le reste des lysats cellulaires ont ensuite été incubés sur roue à 4°C toute la nuit (12h max) sur les billes préparées. Après incubation du lysat sur les billes, 1 lavage des billes a été réalisé en tampon de lyse puis 2 lavages en tampon de base. A l'issu de ces lavages, les billes ont été séchées à la seringue puis incubées dans du tampon de dénaturation Laemmli

2X et bouillies sur bloc chauffant durant 10 minutes à 93°C. Les échantillons ont ensuite été déposés sur un gel Prosieve à 10%, transférés sur membrane de PVDF ou nitrocellulose et révélé à l'aide des anticorps adéquats.

3. Spectrométrie de masse

Afin de réaliser l'étude différentielle de l'intéractome de DC-SIGN à 4 et à 37°C, trois expériences d'immunoprécipitation du récepteur DC-SIGN ont été réalisées à partir de $1,5x10^7$ cellules/condition THP-1 DC-SIGN et THP-1 (contrôle négatif) comme décrit précédemment. Suite à cela, j'ai eu l'opportunité d'être formée par Edith Demettre (plateforme de protéomique, IGH, Montpellier) afin de préparer les peptides issus des protéines contenues dans les immunoprécipitats avant injection au spectromètre de masse.

4. CYTOMETRIE EN FLUX

1. Etude de l'expression du récepteur DC-SIGN par cytométrie en flux (FACS)

Les cellules analysées par cytométrie en flux ont été fixées au préalable (0,5% PFA ou 2% pendant 30 min à 4°C si infection par le VIH-1 de façon à inactiver le virus). Dans le cas d'un marquage intracellulaire, un tampon PBS-BSA-Saponine 0,05% est utilisé. Les anticorps primaires puis les anticorps secondaires adéquats ont été incubés sur les cellules durant 45 minutes à 4°C. Entre chaque étape de fixation et de marquage anticorps, les cellules ont été lavées (centrifugations à 1800 rpm, 4°C, 5 min) en tampon FACS (+/- saponine).

5. BIOLOGIE MOLECULAIRE

1. Transformation bactérienne, extraction et purification des plasmides

Les plasmides contenant le gène d'intérêt sont insérés par choc thermique (incubation ADN/bactérie pendant 30 minutes sur glace puis 45 secondes à 42°c et 10 secondes sur glace avant de remettre les échantillons à température ambiante) dans la souche bactérienne DH5α issue de l'espèce *Escherichia coli*. Les bactéries sont ensuite placées dans du milieu riche sans antibiotiques pendant 1h puis étalées sur des boîtes de pétri contenant de l'agar avec un antibiotique de sélection correspondant suivant le gène de résistance amené par le plasmide. Des clones bactériens sont ensuite incubées dans du milieu LB (Lysogeny Broth) supplémenté avec 100µgl/ml d'antibiotique afin d'amplifier la quantité de bactéries contenant le plasmide d'intérêt. L'extraction et la purification des plasmides ont été effectuées à l'aide des kits Nucleobond®XTra Midi (Macherey-Nagel) ou Plasmid Maxi (Qiagen). La concentration et la pureté des plasmides ont été mesurées à l'aide d'un Nanodrop 1000.

2. Mutagénèse dirigée

Afin de générer des nouvelles constructions mutantes sur deux lysines (K5 et K32) exprimées au niveau du domaine cytoplasmique du récepteur DC-SIGN nous avons utilisé le plasmide pcDNA-3.1-DC-SIGN WT décrit précédemment [117] comme matrice. Les séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées pour la mutagénèse dirigée sont : K5/A (5' CTG CTG CAG TCG CGG TTC CGC GGA GTC ACT CAT GTC ACC 3') K5/R (5' CTG CTG CAG TCG CGG TTC CCT GGA GTC ACT CAT GTC ACC 3') K32/A (5' TGG CCA AGA CAC CCT GCT CGC GTA TCC TCG AGT CTG TCG 3') K32/R (5' TGG CCA AGA CAC CCT GCT CCT GTA TCC TCG AGT CTG TCG 3'). Le codon souligné correspond à la séquence codante mutée pour la lysine en position 5 ou en position 32. Ces amorces oligonucléotidiques ont été conceptualisées au laboratoire et générées par la compagnie Eurofins MWG Operon. La réaction de PCR a été effectuée dans les conditions suivantes à l'aide du Kit QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). Par échantillon ont été ajoutés un mix de déoxynucleotides triphosphate (dNTP), du tampon spécifiquement adapté pour une activité optimale de la polymérase, chaque amorce (forward et reverse), l'ADN plasmidique servant de matrice (ici plasmide pcDNA3.1-DC-SIGN WT) et le tout complémenté avec de l'eau osmosée. Enfin, la polymerase ADN de haute affinité (HF) dérivée de la *PfuUltra* a été ajoutée (2,5U/µl) avant de placer les échantillons dans le thermocycleur. Deux témoins ont été préparés conjointement dans les mêmes volumes et conditions, le témoin négatif ne contenant pas d'ADN et le témoin positif contenant le plasmide pWhitescript 4-5 kb contrôle ainsi que les amorces correspondantes dans les quantités conseillées par le fournisseur.

Les conditions d'amplification suivantes ont été appliquées : la dénaturation dure 30 secondes à 95°C, l'hybridation dure 1 minute à 55°C puis l'élongation dure 2 minutes/kb de plasmide à 68°C et ceci pendant 18 cycles. L'élongation finale dure 7 minutes à 68°C. Ensuite l'ADN du plasmide initial ayant servi de matrice (pcDNA-3.1-DC-SIGN WT) est digéré pendant 1h à 37°C avec l'enzyme de restriction (*Dpn I*). Les échantillons ont été contrôlés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1% puis révélés au SYBR Safe DNA gel stain dans du tampon Tris-Borate EDTA (TBE), puis révélés sous lampe à UV.

3. Séquençage et analyse sur banque de données

Le séquençage des plasmides a été effectué par la compagnie Eurofins MWG Operon (Allemagne). Les amorces utilisées pour le séquençage étaient situées soit au niveau du promoteur (amorce promoteur CMV) soit plus en amont dans la partie non-codante du plasmide (amorce pcDNA3.1). La qualité des séquences obtenues a été vérifiée sur les chromatogrammes visualisés avec le logiciel BioEdit. L'alignement de la séquence du plasmide mutant et du plasmide sauvage a été effectué sur le logiciel en ligne ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). L'analyse de l'expression de récepteurs à la surface des cellules a été réalisée après marquage des cellules à l'aide d'anticorps dilués dans du tampon FACS standard (PBS/1% BSA/0.025% Azide). Pour l'analyse de l'expression totale du récepteur (à la surface et intracellulaire), les anticorps ont été dilués dans un tampon FACS

perméabilisant (tampon FACS /saponine à 0.1%). Une fois marqués, les échantillons ont été acquis à la plateforme MRI à l'aide d'un cytomètre en flux de marque FacsCalibur (Becton Dickinson) assisté du logiciel Cell Quest (Becton Dickinson). L'analyse des données obtenues a été réalisée à l'aide des logiciels CXP analyse (Beckman Coulter), Flowing Software et FlowJo (Tree Star Inc).

6. MICROSCOPIE

1. Marquage immunofluorescent

Les cellules ont été directement cultivées (1h) sur lamelles pré-traitées avec de la polylysine durant 1h à 37°C. Les cellules ont ensuite été fixées avec de la PFA (0.5% ou 2% si infection par le VIH-1) puis perméabilisées à l'aide d'un tampon de perméabilisation (PBS/BSA 0.2%/Saponine 0.05%). Les lamelles sont ensuite incubées avec des anticorps primaires dilués dans le tampon de perméabilisation pendant 45 minutes. Après lavages, l'anticorps secondaire approprié couplé à un fluorochrome est dilué dans le même tampon et incubé sur les cellules pendant 40 minutes. Quand le récepteur DC-SIGN a été engagé par un anticorps, le marquage se fait directement avec un anticorps secondaire d'âne anti-souris couplé au fluorochrome Alexa-568 (Molecular Probes™). Les cellules sont ensuite lavées puis incubées dans une solution de PBS contenant du 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) pendant 1 minute afin de marquer les noyaux. Les lamelles sont ensuite déposées sur des lames porte-objet avec une solution de ProLong (Invitrogen). Les images ont été obtenues soit à l'aide d'un microscope droit à épifluorescence avec les objectifs 63x et 100x piloté par le logiciel Las V3.8 (Leica Microsystems), soit avec le microscope confocal LSM780 piloté par le logiciel ZEN (Carl Zeiss). Les fluorescences émises aux longueurs d'ondes correspondant au vert 488 nm (FITC), rouge 568 nm (PE), rouge lointain 647 nm (APC) et UV 350 nm (DAPI) ont été acquises de façon indépendante. Les images ont été traitées à l'aide du logiciel ImageJ et les quantifications ont été réalisées à l'aide du pluging JaCoP.

2. Microscopie électronique

Les MDDC ont été incubées durant 30 minutes à 4°C ou à 37°C par un anticorps souris anti-DC-SIGN humain (MR1) puis lavées une fois en PBS et fixées en PFA 4% (EMS)/ glutaraldéhyde 0.1% (EMS) en tampon phosphate 0.1M une heure à 4°C. Les échantillons ont ensuite été traités à la plate-forme CEMIPAI (UMS3725), par Aymeric Neyret. Apres rinçage, les groupements aldéhydes libres sont inactivés en NH4Cl 0.05M 30 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite déshydratées par des bains d'éthanol de concentration croissantes (70%/90%/2*100%) puis infiltrées par des mélanges de résine (Lowicryl K4M, EMS) et d'éthanol en concentration croissante de résine avant inclusion en résine pure. La polymérisation se fait sous UV à -20° pendant 3 jours. Les coupes ultrafines sont réalisées avec un ultramicrotome Reichert Ultracut (leica) et récupérées sur des grilles nickel coatées formvar/carbone

(EMS). Après un blocage en tampon Tris protéiné (20mM Tris pH 8.2/ 225mM NaCl / 1% BSA / 1% sérum de chèvre) (TBS), les cellules sont marqués la nuit à 4°C avec des dilutions d'anticorps lapin anti-ATG9. Le marquage secondaire est fait à température ambiante une heure avec un anticorps chèvre anti lapin marqué à l'or 20nm (British Biocell International) au 1/20 et un anticorps chèvre anti souris marqué à l'or 10nm (British Biocell International) au 1/20 (pour marquer l'anti DC-internalisé) dilués en TBS complété avec 1% de teleostan gelatin (sigma). Les grilles sont finalement contrastées avec de l'acétate d'uranyle 2% 20 minutes et observées avec un Tecnai G2 F20 (200KV, FEG) au plateau de microscopie électronique COMET (INM, plate-forme Montpellier RIO Imaging).

7. REACTIFS ET ANTICORPS

Si indiqué, les cellules ont été pré-traitées avec 50µM de chloroquine (Chq) (Sigma) pendant 1h. Le ManLAM (lipoarabinomannane) provenant de *Mycobactérium Kansasii* utilisé nous a été fourni par l'équipe du Docteur Yann Guerardel (Lille). Les anticorps utilisés, leur référence, l'espèce de provenance, le fournisseur ainsi que la taille attendu en western blot ont été répertoriés dans le **tableau 11**.

Anticorps	Référence	Espèce	Usage durant la thèse	Fournisseur
DC-SIGN	MR1 (CRD)	Souris	Engagement, microscopie, FACS	Santa Cruz
DC-SIGN	EBH209 (CRD)	Souris	Facs	eBioscience
DC-SIGN	DCN46 (neck)	Souris	Facs, microscopie, engagement	BD
DC-SIGN	D7F5C (c term part)	Lapin	Western blot	Cell signaling
LC3	L7543	Lapin	Western blot, microscopie	Sigma
GAPDH-HRP	G9295	Souris	Western blot	Sigma
Atg16L	PM040B	Lapin	Microscopie	MBL
Atg16L	ab187671	Lapin	Microscopie	Abcam
Atg13	SAB1307145-400UL	Lapin	Microscopie	Sigma
ULK1	ab128859	Lapin	Microscopie	Abcam
p62 / SQSTM1	H290	Lapin	Microscopie	Santa Cruz
Atg9	ab108338	Lapin	Microscopie	Abcam
Clathrine	/	Lapin	Microscopie	Sérum donné par Paul Mangeat (CRBM)
EEA	ab70521	Souris	Microscopie	Abcam
LAMP1	ab24170	Lapin	Microscopie	Abcam
TRIM25	ab167154	Lapin	Westen blot	Abcam
TRIM25	H-300	Lapin	Western blot	Santa Cruz
V5	R960-25	Mouse	Western blot, microscopie	ThermoFisher
HA	H6908	Rabbit	Western blot	Sigma
GST-HRP	A7340	Rabbit	Western blot	Sigma
HIV Gag p24	KC57	Souris	Microscopie, FACS	Beckman Coulter

Tableau 11 – Liste des anticorps utilisés durant ma thèse

8. STATISTIQUES

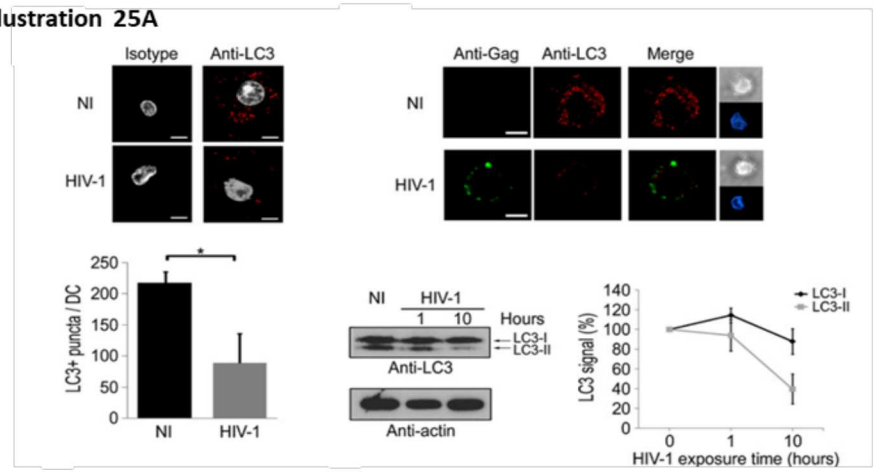
Les études statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET PROBLEMATIQUE DE MON PROJET DE THESE

• **Contexte scientifique** : Le VIH-1 a pour cible majeur les cellules exprimant le récepteur CD4 et le(s) corécepteur(s) CCR5 et/ou CXCR4, ainsi les LT CD4+, les macrophages et des cellules dendritiques (DC) sont des cellules cibles du virus. Du fait de leur localisation dans les muqueuses et dans les couches supra basales cutanées, les DC sont considérées comme étant une des premières cible du VIH-1. Les DC ont été décrites comme étant des cellules très peu infectées productivement puisqu'elles expriment peu de récepteur du VIH-1 (CD4 et corécepteurs) puisque que ce sont ces récepteurs qui permettent l'infection productive dans les DC. Leur caractère réfractaire est aussi expliqué par l'expression de nombreux facteurs de restriction virale dont SAMHD1 [259,260]. Durant les premières heures suivant l'exposition du VIH-1 aux DC (>8h), la cellule dendritique va reconnaître le virus grâce à son large panel de récepteur exprimés en surface. Il est considéré que 80% de l'entrée virale repose sur la reconnaissance et l'endocytose médiées par les récepteurs lectine de type C (CLR) [168,183]. Bien que le récepteur DC-SIGN ne soit pas le seul CLR permettant l'entrée du virus, il est particulièrement exprimé à la surface de certains sous-types de DC [433] et son affinité de reconnaissance du virus a été montré comme étant meilleure que celle du récepteur CD4 [434]. Ce récepteur notamment caractérisé pour sa capacité de reconnaissance du VIH-1 a aussi été montré comme étant impliqué dans les étapes tardives de l'infection en participant à la *trans*-infection [105] lors de contacts cellulaires via la formation de synapses virologiques [188]. En outre, durant les étapes précoces de l'infection des DC, il a été décrit que le virus était fortement dégradé (>80% de l'input viral dès les premières heures) par voie lysosomale et protéasomale [117,130,141]. Des travaux précédemment réalisés par mon équipe démontrent que le mécanisme de l'autophagie participe à la dégradation lysosomale du VIH-1 dans les DC [158]. Néanmoins, après quelques heures (>10H), le primo-contact exercé par l'enveloppe virale mène à l'inhibition de l'autophagie par un mécanisme induisant la phosphorylation de mTOR qui est un des principaux régulateurs négatifs de l'initiation autophagique. La diminution de l'autophagie dans les cellules infectées se traduit par une diminution marquée du nombre de vésicules $LC3^+$, un faible niveau de LC3-II (après 10h) en western blot et surtout une augmentation de cellules infectées (après 20h) mise en évidence par cytométrie en flux et par microscopie confocale à fluorescence [158] (**illustration 25A**). Cette inhibition autophagique altère aussi les réponses innées (TLR-4 et -8) et adaptatives (CMH-II), démontrant ainsi l'importance de la participation de la virophagie dans les DC. Durant les premières heures, ces travaux montrent que la protéine virale Gag du VIH-1 co-localise très rapidement (dès 15 minutes) avec la protéine LC3 (marqueur de l'autophagie) et plus tardivement (>1h) avec LAMP-1 (marqueur des compartiments lysosomaux) (**illustration 25B**). De manière intéressante, le VIH-1 est retrouvé dans des organelles à doubles membranes en TEM et après 30 minutes d'incubation des DC avec un anticorps anti-DC-SIGN (AC), la gp120 du VIH-1 (protéine recombinante) et le VIH-1, le récepteur DC-SIGN co-localise fortement (25% VIH-1 à 40% pour les AC et la gp120) avec des vésicules $LC3^+$ (**illustration 25C**). Le croisement de la voie autophagique lors de l'endocytose du VIH-1 par le

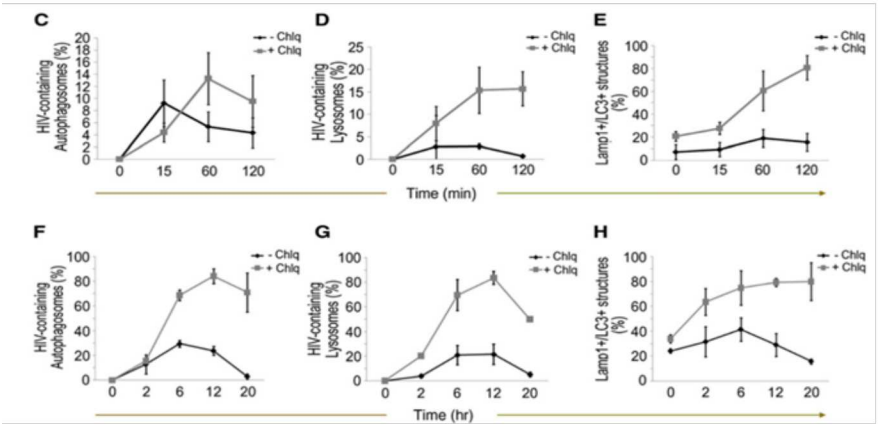
récepteur DC-SIGN ainsi que l'implication du récepteur dans l'amplification des réponses immunes [91,92] et dans les étapes tardives de l'infection (*trans*-infection), font du récepteur DC-SIGN un candidat idéal pour l'étude du lien entre l'entrée du VIH-1, la voie autophagique et les réponses immunes qui en découlent.

Illustration 25A



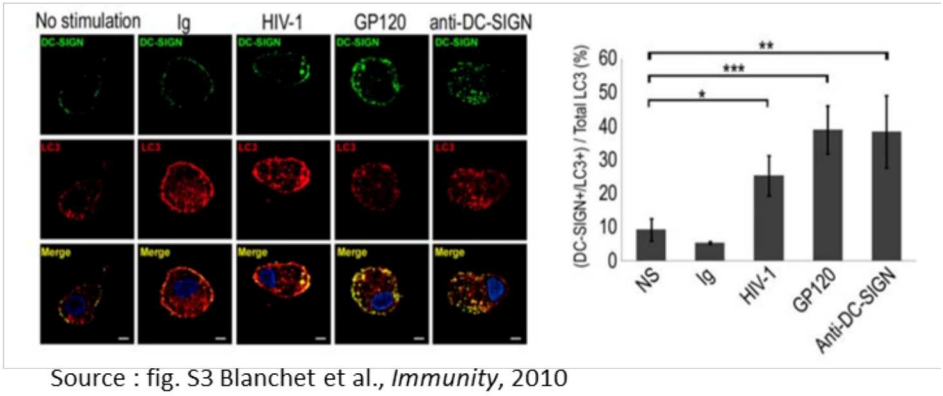
Source : fig. 1 Blanchet et al., *Immunity*, 2010

Illustration 25B



Source : fig. 4 Blanchet et al., *Immunity*, 2010

Illustration 25C



Source : fig. S3 Blanchet et al., *Immunity*, 2010

Illustration 25 – Contexte scientifique de ma thèse

•**Problématique de thèse :** À l'issus de ces données, certaines questions ont alors été soulevées : **L'autophagie peut-elle être induite par un CLR ? Cette autophagie mise en place est-elle sélective ? Sélective du récepteur (CLR), du pathogène ? Quels sont les partenaires autophagiques intervenant dans cette autophagie antivirale dans les DC ? Peut-elle être appliquée à d'autres cellules myéloïdes ou présentatrices d'antigènes ? Cette virophagie récepteur-médiée peut-elle constituer une cible thérapeutique ?**

Mon projet de thèse avait pour objectif de mieux comprendre comment la virophagie anti-VIH-1 est mise en place dans les DC afin de contrer l'échappement viral, pour cela nous avons décidé d'étudier les premières étapes d'entrée du virus dans les DC. Jusqu'à présent, très peu d'études ont fait le lien entre l'implication d'un CLR et l'induction d'une autophagie antivirale et peu de preuves relient le récepteur DC-SIGN et la voie autophagique. Le récepteur DC-SIGN est un récepteur d'une importance capitale dans la relation DC-VIH-1 notamment du fait de son rôle de récepteur de reconnaissance de pathogènes (PRR), de sa contribution aux réponses immunes contrastant avec sa participation à la dissémination virale durant les étapes tardives de l'infection. C'est dans ce contexte que les résultats obtenus lors de mon projet de thèse viennent apporter de nouvelles évidences sur l'implication de la dégradation autophagique du VIH-1 dans les DC. En effet, pour la première fois, mes résultats de thèse montrent qu'un CLR (DC-SIGN) peut directement induire l'activation de la voie autophagique et recruter des partenaires cellulaires pouvant participer à l'acheminement du VIH-1 vers la dégradation lysosomale via une virophagie qui pourrait s'avérer sélective.

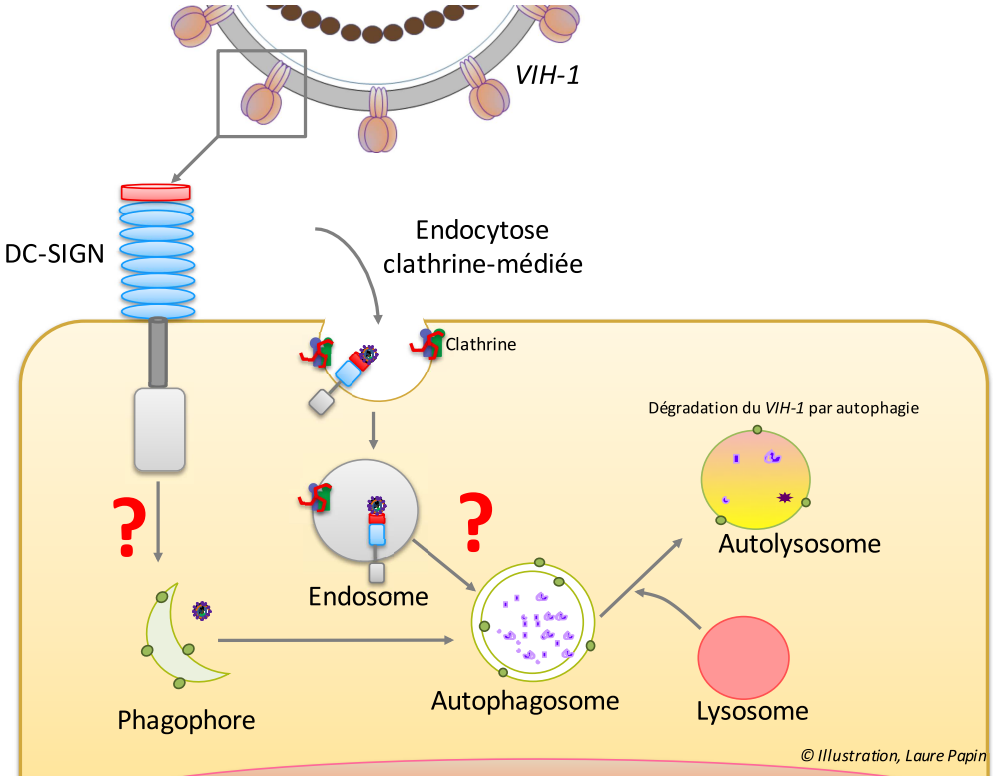


Illustration 26 - Problématique de thèse

RESULTATS

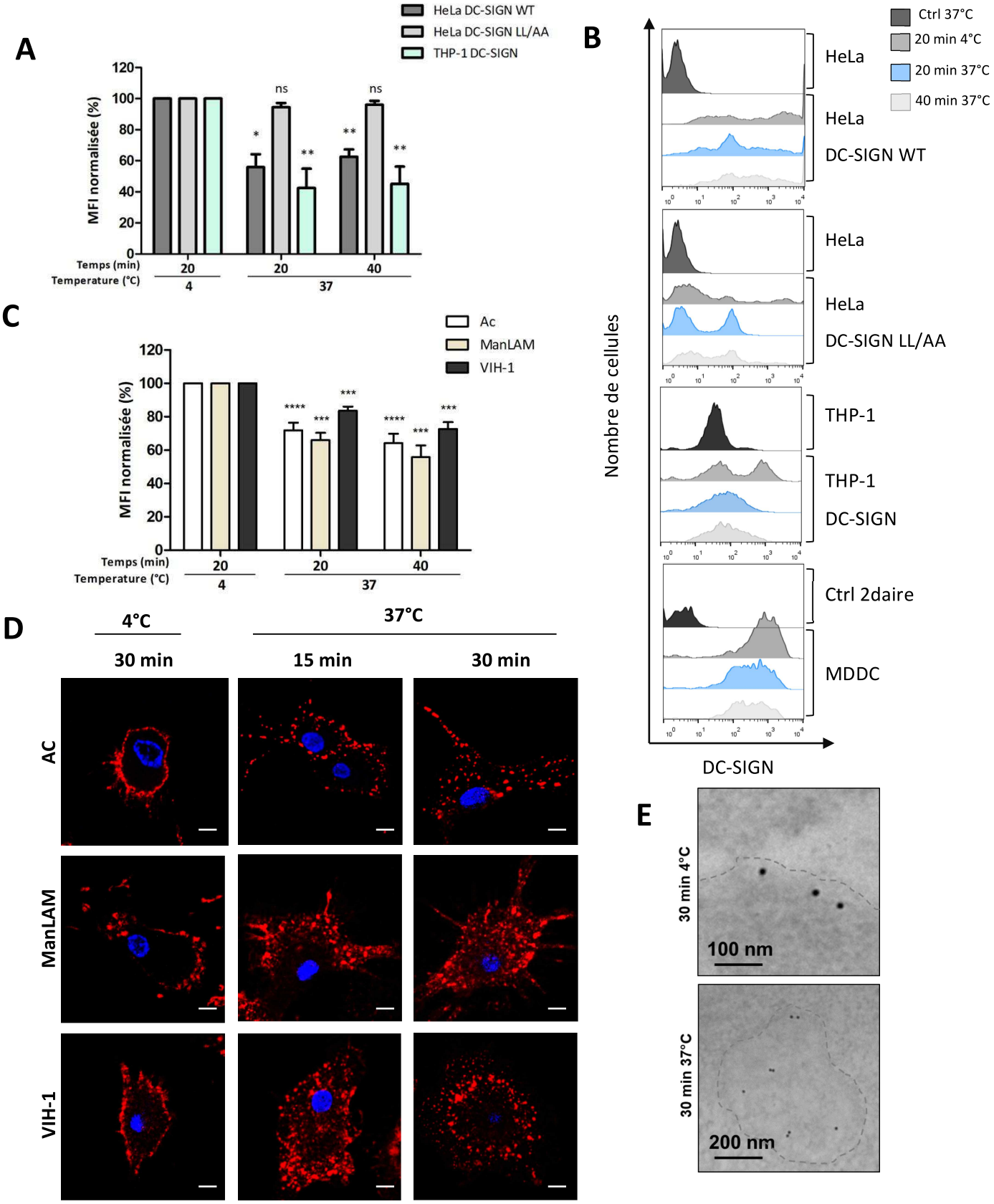


Figure 1 - Modèle d'internalisation du récepteur DC-SIGN endogène (MDDC primaires) ou exprimé de manière exogène dans des lignées cellulaires (HeLa et THP-1)

(A) Des cellules HeLa exprimant DC-SIGN WT ou DC-SIGN LL/AA ou des cellules THP-1 DC-SIGN ont été incubées à 4°C ou 37°C avec 5µg/ml d'anticorps anti-DC-SIGN (AC) pendant les temps indiqués. L'endocytose du récepteur DC-SIGN a été analysée par cytométrie en flux et les données correspondent au ratio de la MFI (moyenne de l'intensité de fluorescence) au temps indiqué puis comparé la MFI à 4°C. Les données sont des moyennes ± s.d issues de n=4 expériences indépendantes **(B)** Cytogrammes représentatifs des cinétiques d'internalisation du récepteur dans les différents modèles cellulaires indiqués. En abscisses sont représentées les intensités de fluorescence d'expression de DC-SIGN et en ordonnées le nombre de cellules acquises. Les DC **(C)** directement cultivées sur lamelles **(D)** ont été mises en contact avec l'AC ou 2µg/ml de ManLAM lipoarabinomanne ou du VIH-1-R5 (MOI 5) durant 30 minutes à 4°C ou 15 et 30 minutes à 37°C. Barre d'échelle 5µm. **(C)** L'endocytose du récepteur DC-SIGN a été analysée par cytométrie en flux et **(D)** par microscopie confocale (objectif x63) comme décrit dans les méthodes. Le noyau a été marqué avec du dapi (en bleu). Les données sont des moyennes ± s.d issues de n=7 donneurs indépendants. **(E)** L'internalisation du récepteur DC-SIGN a été visualisé par microscopie électronique après 30 minutes d'engagement par l'AC à 4°C ou à 37°C. Le marquage de DC-SIGN a été réalisé à l'aide d'anticorps secondaires couplés à des billes d'or de 10 nm de diamètre. Statistiques ns : non significatif * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ***$P<0.001$ (two-tailed *t*-test).

1. MISE EN PLACE DE L'EXPRESSION ET DE L'INTERNALISATION DU RECEPTEUR DC-SIGN A L'AIDE DE DIFFERENT MODELES CELLULAIRES ET LIGANDS

Dans un premier temps nous avons mis en place différents modèles cellulaires d'étude de l'internalisation du récepteur DC-SIGN afin de pouvoir déterminer le routage du récepteur après son engagement (**figure 12 - annexe 1A**). Nous avons d'abord comparé l'internalisation du récepteur DC-SIGN sauvage (WT) ou muté sur le motif dileucine LL/AA, transfecté dans la lignée cellulaire HeLa (**fig. 1A, B**). Le mutant DC-SIGN LL/AA a été décrit précédemment pour être déficient pour l'endocytose [119,435]. Nous avons aussi étudié l'internalisation de DC-SIGN dans la lignée myélo-monocytique THP-1 exprimant stablement le récepteur DC-SIGN après transduction (provenant du programme NIH AIDS reagents) (phénotypage en **figure 12 - annexe 1B et C**). Et enfin dans les cellules dendritiques dérivée de monocytes MDDC grâce à de l'IL-4 et du GM-CSF (appelées DC) (phénotypage en **figure 12 - annexe 1D**) exprimant le récepteur de façon endogène. Les cellules ont été incubées en condition saturantes avec soit des anticorps monoclonaux de souris anti-DC-SIGN humain (appelé par la suite AC, 5µg/ml) (**fig. 1A à E**), soit du lipoarabinomannane (ManLAM provenant de *Mycobactérium Kansasii*, 2µg/ml) (**fig. 1B, D**) soit infectées avec le VIH-1 (R8bal R5ou R9 X4, MOI 5) (**fig. 1. B, D**) pendant 20 minutes à 4°C (considéré ici comme le contrôle) ou placées à 37°C pendant 20 et 40 minutes (**figure 12 - annexe 1A**). À 4°C, les activités enzymatiques sont très fortement ralenties et les phénomènes liés à la fluidité membranaire comme la diffusion protéique et l'endocytose sont très limités. En revanche, la fixation du ligand sur le récepteur n'est pas affectée. Les cellules ont ensuite été fixées après la cinétique d'internalisation et marquées à l'aide d'un anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé au fluorochrome allophycocyanine (APC) pour apprécier l'expression en surface du récepteur DC-SIGN par cytométrie en flux. L'expression du récepteur DC-SIGN présent à la surface des cellules a été mesurée grâce à la moyenne de fluorescence (MFI). Pour chaque modèle cellulaire la MFI à 4°C est considérée comme un contrôle négatif d'internalisation du récepteur DC-SIGN. Une normalisation (pourcentage) a été nécessaire pour tenir compte du processus réellement actif d'internalisation mais il est évident que le niveau d'endocytose du récepteur est ainsi sous-estimé. Après 20 et 40 min d'incubation à 37°C en conditions saturantes de ligand, la majorité des récepteurs sont engagés. Nous avons donc décidé de faire une analyse « par exclusion » en marquant (anticorps secondaire couplé à un fluorochrome) les récepteurs (engagés ou non) encore présents à la surface cellulaire après la cinétique d'endocytose. Nous rapportons alors la MFI à 4°C (récepteur engagé mais non internalisé) à la MFI à 37°C (20 ou 40 min). Nous considérons ainsi que ce ratio MFI 4°C/37°C correspond à la diminution du nombre de récepteurs à la surface cellulaire au cours du temps, témoignant de l'internalisation ligand-dépendante du récepteur DC-SIGN (**fig. 1.A, B, C**).

Comme attendu les cellules HeLa transfectées avec le récepteur mutant LL/AA expriment des niveaux similaires à 4°C ou à 37°C après incubation des cellules avec l'AC (**fig. 1A, B**). Ceci confirme ainsi que le récepteur DC-SIGN muté sur le motif dileucine représente un bon contrôle négatif d'endocytose. Les lignées cellulaires (HeLa et THP-1) exprimant le récepteur DC-SIGN (WT) présentent des niveaux de MFI significativement diminués à 37°C, comparé à 4°C, après 20 ou 40 minutes d'incubation des cellules avec l'AC témoignant de l'internalisation du récepteur (**fig. 1A, B**). En effet, le niveau d'internalisation du récepteur atteint environ 40% dans les cellules HeLa et jusqu'à environ 60% pour les THP1-DC-SIGN (**fig. 1A**). Une internalisation significative du récepteur DC-SIGN induite par les trois ligands (**figure 12 - annexe 1A**) a aussi pu être observée dans des MDDC (DC) après incubation des cellules avec des anticorps anti-DC-SIGN (**fig. 1 B, C**) mais aussi avec deux ligands naturels du récepteur, le ManLAM ou le VIH-1 (**fig. 1C**). Pour les cellules mises en contact avec le ManLAM ou le VIH-1, les cellules ont été fixées après la cinétique d'internalisation et marquées à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris anti-DC-SIGN humain puis à l'aide d'un anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé au fluorochrome allophycocyanine (APC). Après analyse par cytométrie en flux, les niveaux de MFI obtenus ont été traités et normalisés comme précédemment (**fig. 1C**). Ces résultats montrent que bien que les ligands utilisés soient différents, le niveau de récepteur internalisé à 20 et 40 minutes est significativement similaire pour les 3 conditions aux mêmes temps donnés avec environ 20% (pour le VIH-1) et jusqu'à 30-35% (AC et ManLAM). Après mise en contact des DC avec les trois ligands précédemment décrits (AC, ManLAM, VIH-1), l'internalisation du récepteur a aussi été visualisée par microscopie confocale (**fig. 1D**) et par microscopie électronique à transmission TEM (incubation uniquement avec l'AC) (**fig. 1E**). En présence des ligands, à 4°C le récepteur est retrouvé majoritairement en surface et après 20 ou 40 minutes à 37°C le récepteur forme des clusters et est relocalisé dans de petites vésicules à proximité de la surface plasmique dans le cytoplasme (**fig. 1D**). En TEM nous pouvons même constater que le récepteur est retrouvé après 30 minutes à 37°C dans des structures vésiculaires plus grandes ressemblant à des endosomes, le traitement lié au marquage immunogold n'étant pas adapté pour une visualisation précise des structures cellulaires, nous n'avons pas pu discerner de manière résolutive la structure de ces vésicules endosomales, mais leur taille semblait varier de 150 à 400 nm de diamètre (**fig. 1E**). Ainsi, les différentes lignées cellulaires et cellules primaires exprimant le récepteur DC-SIGN nous ont permis d'établir un modèle relevant d'étude de l'internalisation du récepteur DC-SIGN induite par différents ligands naturels (ManLAM, VIH-1) ou non naturels mais plus spécifiques (AC).

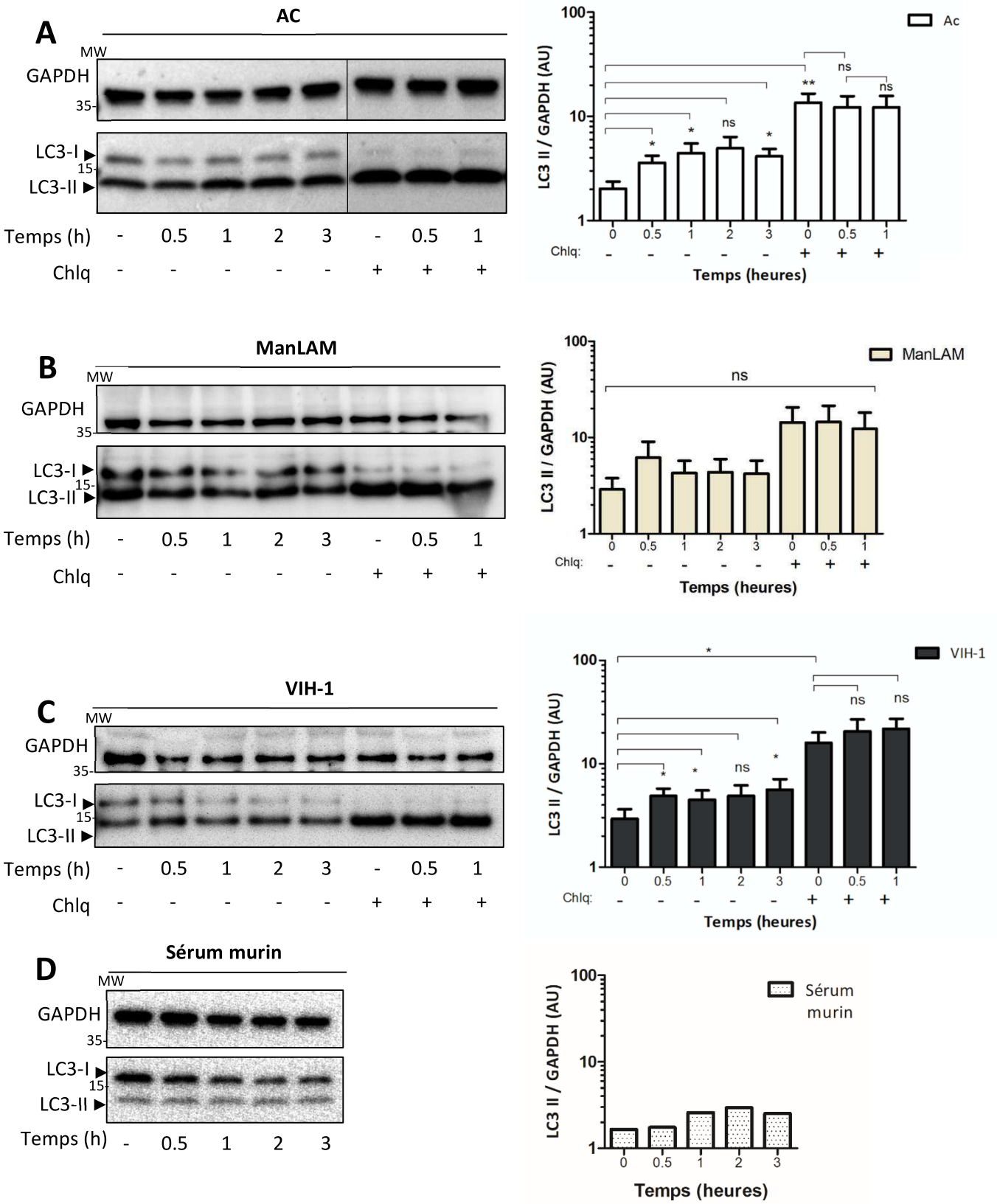


Figure 2 - L'internalisation du récepteur DC-SIGN induit l'autophagie

Les DC ont été mises en contact ou non avec (A) AC, (B) ManLAM, (C) *VIH-1*, (D) sérum de souris : durant 0.5h, 1h, 2h ou 3h. Le point 0 est un contrôle négatif correspondant aux DC directement lysées. Les cellules ont été prétraitées ou non avec 5µg/ml de chloroquine (Chq) durant 30 minutes. Panneau de gauche : La modulation de l'autophagie a été analysée par Western Blot (WB) et révélée à l'aide d'anticorps anti-LC3 et anti-GAPDH. Panneau de droite : Le ratio LC3-II / GAPDH a été analysé par densitométrie (AU, unités arbitraires). Les barres de l'histogramme sont des moyennes ± s.d. provenant de n=6 donneurs différents. . Statistiques * P < 0.05 ** P < 0.01 ***P<0.001 (two-tailed t-test). MW : Molecular weight (poids moléculaire), poids théoriques : GAPDH 37 kDa, LC3-I 18 kDa, LC3-II 15 kDa.

2. L'ENGAGEMENT DU RECEPTEUR DC-SIGN INDUIT LE FLUX AUTOPHAGIQUE

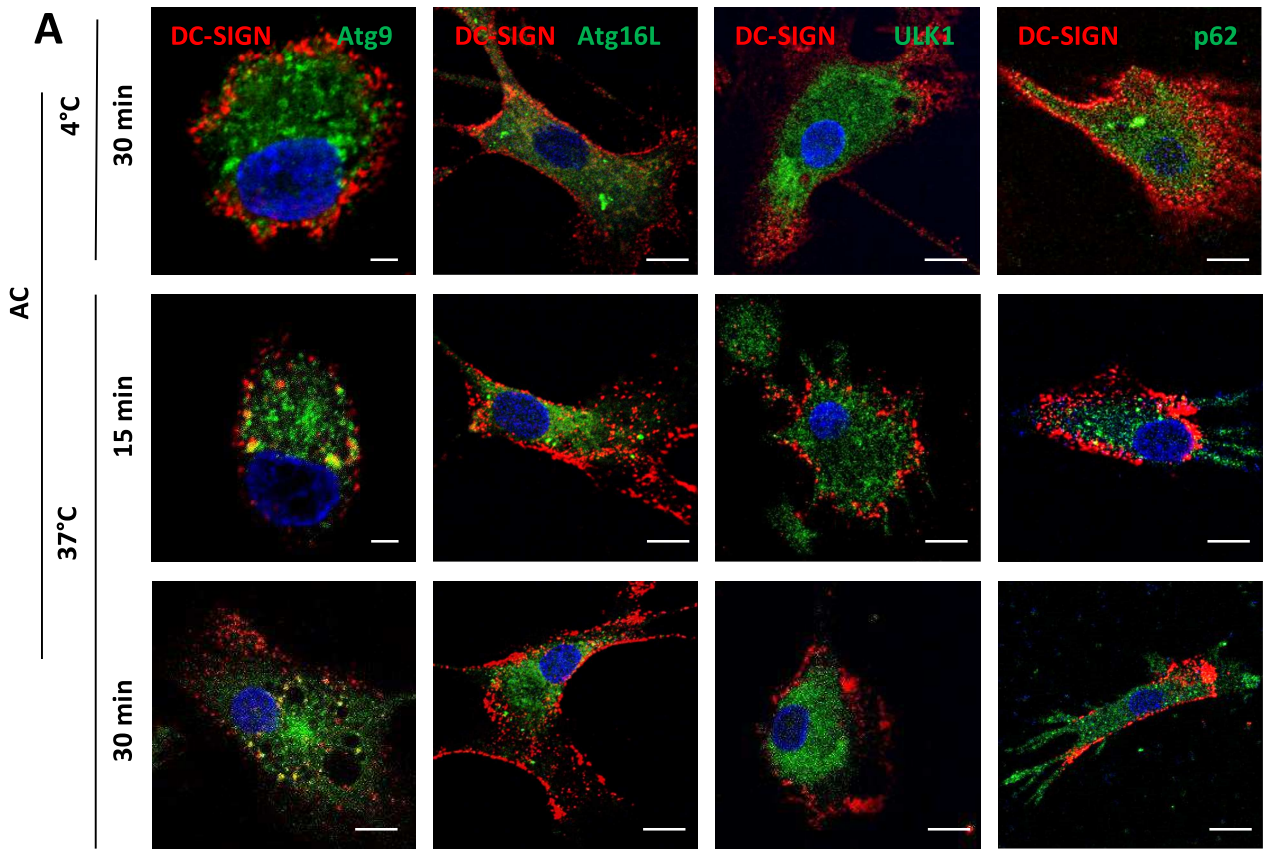
Il a précédemment été montré qu'après son internalisation, le VIH-1 était retrouvé rapidement (dès 15 minutes) dans des vésicules $LC3^+$ (microscopie confocale) à doubles membranes (microscopie électronique), suggérant que l'autophagie pourrait agir en tant que mécanisme antiviral dans les DC [158]. De manière intéressante, les auteurs ont constaté des colocalisations entre des vésicules $LC3^+$ et le récepteur DC-SIGN internalisé 30 minutes à l'aide d'anticorps anti-DCSIGN, de gp120 (Env du VIH-1) ou le VIH-1 suggérant ainsi un lien entre l'endocytose DC-SIGN médiée du VIH-1 et la voie autophagique. Suite à la mise en place de modèles cellulaires adaptés pour l'étude de l'internalisation du récepteur DC-SIGN (**fig. 1**), nous avons souhaité évaluer l'effet de l'internalisation du récepteur DC-SIGN en tant que récepteur de reconnaissance des pathogènes (PRR), sur la modulation de l'autophagie. Pour cela nous avons réalisé une cinétique d'internalisation du récepteur DC-SIGN dans les DC en présence des trois ligands décrit précédemment (AC, ManLAM, VIH-1) (**fig. 2A, B, C**) ou en présence de sérum murin (**fig. 2D**) à 37°C durant 0.5, 1, 2, 3 heures. Le point 0 minute correspond à des DC directement lysées nous permettant d'obtenir le niveau initial d'expression de la protéine LC3 pour chaque condition (**fig. 2**). Comme évoqué précédemment dans le chapitre D.9.1.3.3., la protéine LC3 est considérée comme un marqueur cellulaire permettant de suivre le flux autophagique par la conversion de la forme cytoplasmique LC3-I en LC3-II qui est la forme lipidée accrochée aux membranes autophagosomales. De plus la quantité de LC3-II est proportionnelle au nombre d'autophagosomes, permettant ainsi l'étude du flux autophagique par western bot [324].

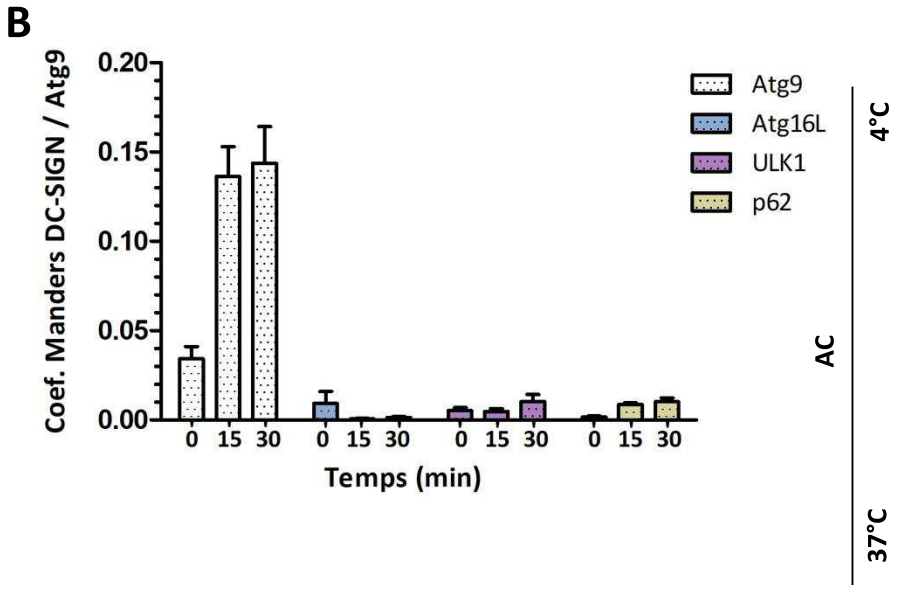
La cinétique d'internalisation du récepteur a été réalisée en présence ou non d'un prétraitement à la chloroquine (Chq 5µg/ml) ayant pour effet de bloquer les étapes tardives du flux autophagique en inhibant l'acidité lysosomale et donc *in fine* la dégradation des cargos. Les cellules ont été lysées suivant le temps indiqué et la modulation du flux autophagique pour chaque condition a été analysée dans les lysats cellulaires par immunoblot avec des anticorps anti-LC3 (**fig. 2A, B, C, D, panneaux de gauche**). Les niveaux de LC3-II ont été quantifiés par densitométrie et normalisés avec le niveau d'expression de GAPDH (contrôle protéique invariant) dans les échantillons correspondants. Suite à cela, nous avons comparé le ratio LC3-II/GAPDH initial (0 minute) avec celui exprimé durant chacun des temps de la cinétique d'internalisation du récepteur avec les différents ligands, les histogrammes représentent la moyenne des expérimentations effectuées (n=6) (**fig. 2A, B, C, D, panneaux de droite**). Nous observons que le ratio LC3-II/GAPDH après 30 minutes, 1H et 3H d'incubation avec les AC et le VIH-1 augmente significativement reflétant une augmentation de la forme lipidée de la protéine LC3 (LC3-II) et donc témoignant d'une induction du flux autophagique. Ainsi, l'internalisation du récepteur DC-SIGN par les anticorps dirigés contre le récepteur et par le VIH-1, induit l'autophagie (**fig. 2A, C**).

Concernant l'incubation des DC en présence de ManLAM, la tendance est à l'induction du flux autophagique mais le nombre d'expériences réalisées (n=6) ne nous a pas permis de confirmer la significativité de ces variations.

L'inhibition de la maturation des autophagosomes (inhibition de l'acidification lysosomale) par la chloroquine génère comme attendu, une augmentation de LC3-II témoignant de l'accumulation d'autophagosomes dans les DC. Le flux autophagique des DC est plus dynamique comparé à d'autres cellules non présentatrices d'antigènes, ce qui explique que la mise en contact avec les différents ligands des DC prétraitées à la chloroquine ne permet pas d'observer une différence majeure d'induction du flux autophagique après 30 minutes ou 1h comme retranscrit par le ratio LC3-II/GADPH. En effet, le prétraitement à la chloroquine 30 minutes avant l'engagement du récepteur semble avoir saturé l'augmentation de LC3-II intracellulaire et il en devient difficile d'observer une différence significative. Enfin, l'incubation des DC avec du sérum de souris composé d'IgG du même isotype que les anticorps anti-DC-SIGN utilisés, n'induit pas l'autophagie de manière significative ce qui indique que l'internalisation de DC-SIGN via les anticorps est spécifique du récepteur avec une très faible influence des récepteurs Fc capables de reconnaître les IgG (**fig. 2.D**).

En conclusion, l'engagement du récepteur DC-SIGN par les différents ligands testés induit rapidement et spécifiquement un flux autophagique dont l'activité semble concomitante avec l'internalisation du récepteur.





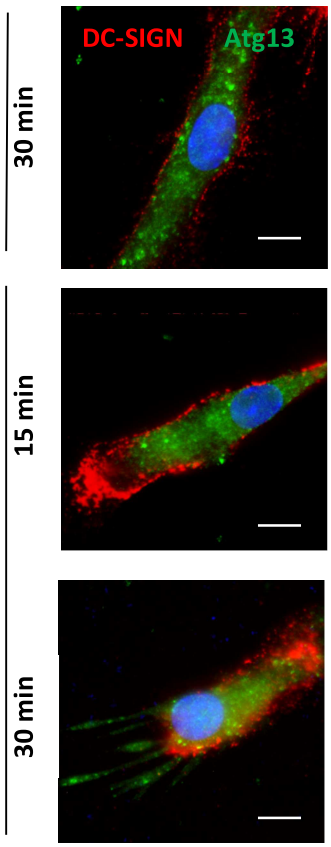


Figure 3 - Identification de partenaires autophagiques du récepteur DC-SIGN

(A) Analyse par microscopie confocale de l'association entre DC-SIGN et des marqueurs autophagiques (ULK1, Atg16L, Atg13, Atg9), ou d'autophagie sélective (p62). Le récepteur DC-SIGN a été engagé avec l'AC 30 minutes à 4°C ou 15 et 30 min à 37°C. Les DC fixées ont été marquées avec des anticorps anti-Atg9 (1ere colonne), anti-Atg16L1 (2e colonne), anti-ULK1 (3e colonne), anti-p62 (4e colonne), anti-Atg13 (colonne du bas) puis avec des Ac secondaires anti-souris Alexa 568 (DC-SIGN en rouge) et anti-lapin Alexa 488 (protéines autophagiques en vert), le noyau a été marqué au dapi (en bleu). Barre d'échelle 5µm **(B)** Quantification de la co-localisation de DC-SIGN avec les différentes protéines Atg analysée grâce au logiciel ImageJ (NIH), pluging JACoP avec (coef. Manders: coefficient de Manders). Les barres sont des moyennes ± s.d. de 3 expériences et donneurs indépendants, avec n=30 cellules par conditions.

3. ETUDE DU TRAFFIC POST-ENDOCYTIQUE ET RECHERCHE D'INTERACTIONS ENTRE LE RECEPTEUR DC-SIGN ET DES PROTEINES AUTOPHAGIQUES

L'engagement du récepteur DC-SIGN par différents ligands induit l'autophagie. Une des hypothèses de mon projet de thèse est que le VIH-1 pourrait être ciblé spécifiquement vers la dégradation lysosomale via la voie autophagique après l'internalisation DC-SIGN-dépendante. L'induction de cette autophagie récepteur-dépendante pourrait alors influencer les étapes subséquentes de transmission virale (*trans*-infection) ainsi que la présentation antigénique, notamment exogène, via les molécules du CMH-II. Il existe différents types d'autophagie pouvant être impliqués dans la réponse cellulaire antimicrobienne, comme par exemple la macro-autophagie, la LAP (LC3-Associated phagocytosis), l'autophagie sélective et l'autophagie de précision. Mieux connaitre les partenaires impliqués dans l'autophagie induite très rapidement dans les DC suite à l'entrée du VIH-1, nous permettrait alors d'éclaircir les mécanismes mis en jeu durant ces étapes précoces. De ce fait, nous avons réalisé une recherche d'association entre le récepteur DC-SIGN et certaines protéines impliquées dans l'autophagie. Les protéines Ulk1 et Atg13 (cruciales pour l'initiation de la macro-autophagie et la formation de l'autophagosome), Atg9 et Atg16L (impliqués dans l'apport de membranes pour la formation d'autophagosomes) et la protéine SQSTM1/p62 (récepteur autophagique généralement associé à l'autophagie sélective). Comme précédemment, les DC ont été incubées en présence d'AC anti-DC-SIGN durant le temps indiqué. Dans les DC, nos conditions expérimentales et aux temps testés d'internalisation du récepteur (15-30 min à 37°C), Atg13, ULK1, p62 et Atg16L ne co-localise pas avec le récepteur DC-SIGN (**fig. 3A**). De manière intéressante, seule la protéine Atg9 co-localise avec le récepteur DC-SIGN (**fig. 3A, B**). Cette association DC-SIGN/Atg9 est significativement plus importante (13% après 15min et 14% après 30 min) en comparaison avec le récepteur non internalisé (3% seulement à 0 min) (**fig. 3B, 4B, C**).

Dans le but de confirmer cette association, nous avons co-transfecté ou pas des cellules HEK293T avec des plasmides exprimant le récepteur DC-SIGN ainsi que la protéine Atg9-HA qui a ensuite été immunoprécipitée à l'aide d'anticorps anti-HA à partir des lysats cellulaires, dont une partie a d'ailleurs été conservée pour servir de contrôle d'expression protéique de départ (input 10%). Après révélation à l'aide d'anticorps anti-DC-SIGN, nous avons pu observer alors que DC-SIGN se retrouvait effectivement co-immunoprécipité avec la protéine Atg9 (**fig. 4A**). Le signal de DC-SIGN était bien absent dans les « input » et les immunoprécipitats obtenus à partir de cellules dans lesquels le récepteur n'est pas surexprimé confirmant la spécificité du signal donné par les anticorps en western blot. Le contrôle de charge réalisé après révélation des « input » avec un anti-GAPDH montre que les lysats traités contiennent bien une quantité de protéines totales similaire (**fig. 4A**).

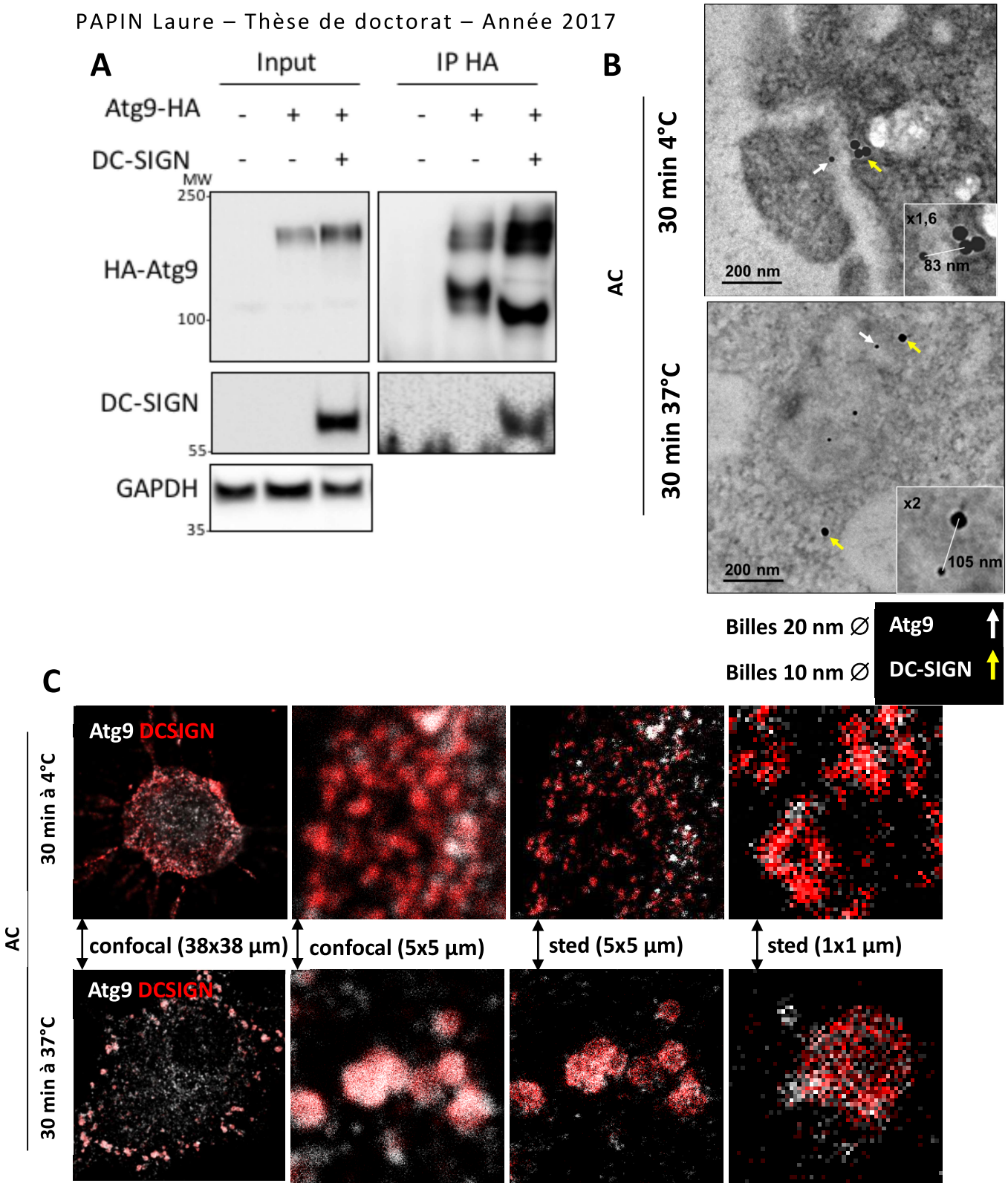


Figure 4 - Caractérisation des structures formées et de l'association entre DC-SIGN et Atg9

(A) Immunoprécipitation (IP) de la protéine Atg9-HA à partir de lysats de cellules HEK293T co-transfectées ou non avec Atg9-HA et/ou DC-SIGN. Une partie des lysats et les co-IP ont été analysées par western blot révélés avec des anticorps polyclonaux anti-DC-SIGN (panneaux du milieu). Le contrôle de matériel immunoprécipité a été révélé avec un anti-HA et le contrôle de charge protéique dans les inputs révélés avec un anti-GAPDH. MW : Molecular weight (poids moléculaire), poids théoriques : Atg9-HA 100 kDa, DC-SIGN 44 kDa, GAPDH 37 kDa.
Le récepteur DC-SIGN exprimé par les DC a été internalisé avec l'anticorps monoclonal anti-DC-SIGN durant 30 minutes à 4°C ou à 37°C. **(B)** Les DC fixées ont été marquées avec un anti-Atg9 puis traitées par immunomarquages avec des anticorps secondaires anti-souris couplés à des billes d'or de 10 nm de diamètre (DC-SIGN, flèches blanches) et anti-lapin couplés à des billes d'or de 20 nm de diamètre (Atg9, flèches jaunes). L'évaluation de la distance entre les billes d'or a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ (NIH). L'échelle de taille est représentée par la barre noire (200nm). **(C)** Les DC traitées sur lamelles ont été fixées puis marquées avec un anticorps polyclonal anti-Atg9 suivi d'anticorps secondaires anti-souris AF594 (DC-SIGN, en rouge sur l'image) anti-lapin Abberior STAR 635P (Atg9, en blanc sur l'image).

Afin d'étudier plus en détails l'association générée entre DC-SIGN et Atg9, des expériences d'internalisation du récepteur DC-SIGN par l'AC ont été réalisées dans les DC comme précédemment. Après la fixation des DC, le récepteur DC-SIGN engagé ou internalisé (AC) et la protéine Atg9 (marqué au préalable par un anticorps polyclonal anti-Atg9) ont été marqués par des anticorps secondaires couplés à des billes d'or de tailles différentes (DC-SIGN 10 nm et Atg9 20 nm) suivant l'espèce de l'anticorps (en collaboration avec Aymeric Neyret, plateforme CEMIPAI, Montpellier). Nous observons en TEM que dès 30 minutes d'engagement par l'AC à 4°C, DC-SIGN et Atg9 semblent être associés directement à la membrane plasmique (**fig. 4B, image du haut**). Ainsi, Atg9 et DC-SIGN sont retrouvés très proches à 4°C (83 nm de distance). L'incubation à 37°C montre une augmentation du nombre de récepteurs DC-SIGN dans des vésicules intracellulaires très proche d'Atg9 (105 nm de distance) (**fig. 4B, image du bas**). De plus, des DC traités et marquées à l'aide d'anticorps comme auparavant ont été analysées par microscopie confocale suivie d'acquisitions en super résolution (STimulated Emission Depletion (STED) (en collaboration avec le Docteur Martin Lehmann, Berlin, Allemagne) (**fig. 4C**). Les analyses par microscopie STED nous ont permis de définir que les clusters DC-SIGN^{+}/Atg9^{+} formés à 37°C mesuraient environ 0,4 µm de diamètre (**fig. 4C**) concordant avec les tailles des vésicules endosomales observées auparavant en TEM (**fig. 1E**).

La protéine autophagique transmembranaire Atg9 est décrite dans la littérature comme étant notamment un transporteur de membranes lipidiques provenant de vésicules d'endocytose à clathrine [330]. Nos données montrent pour la première fois que la protéine Atg9, s'associe au niveau de la membrane plasmique avec le récepteur de surface DC-SIGN impliqué dans l'immunité innée des DC et semble suivre le trafic du récepteur durant son internalisation. Cela suggère que la protéine Atg9 pourrait être impliquée dans le trafic du récepteur DC-SIGN vers la voie autophagique.

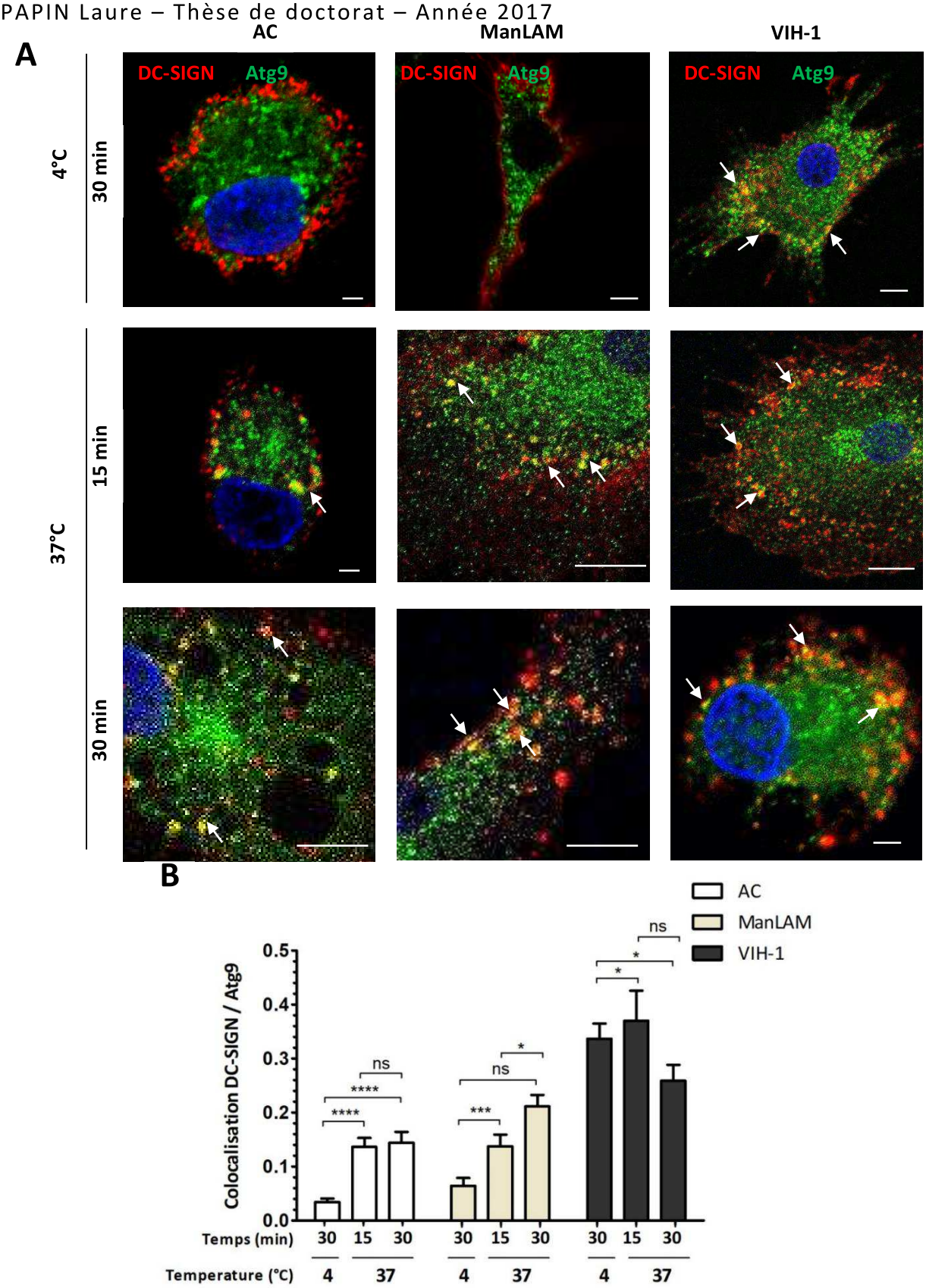


Figure 5 - Le récepteur DC-SIGN interagit avec la protéine Atg9 durant l'internalisation du récepteur par le VIH-1 et le ManLAM

Le récepteur DC-SIGN a été engagé dans les DC avec les trois agonistes AC (1ere colonne) ou ManLAM (2e colonne) ou le VIH-1 à MOI 2 (3e colonne) durant 30 minutes à 4°C ou 15 et 30 minutes à 37°C. **(A)** Le récepteur DC-SIGN et la protéine Atg9 ont été marqués comme précédemment et visualisés par microscopie confocale à fluorescence. Lorsque DC-SIGN a été engagé avec le LAM ou le VIH-1, l'AC a été utilisé pour le marquage et les images montrent DC-SIGN (rouge) Atg9 (vert) et le noyau a été marqué au dapi (en bleu). **(B)** Quantification de la co-localisation de DC-SIGN avec Atg9 analysée grâce au logiciel ImageJ (NIH), pluging JACoP avec (coef. Manders: coefficient de Manders). Barre d'échelle 5µm. Les barres sont des moyennes ± s.d. de 3 expériences indépendantes, avec n=30 cellules par conditions. Statistiques ns : non significatif * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ***$P<0.001$ (Mann Whitney two-tailed).

4. L'ENTREE DU VIH-1 DANS LES DC INDUIT UNE FORTE ASSOCIATION ENTRE LE RECEPTEUR DC-SIGN ET ATG9

Pour étendre ces observations, nous avons ensuite réalisé une cinétique d'internalisation du récepteur DC-SIGN avec les deux ligands naturels du récepteur décrits précédemment (**figure 12 - annexe 1A**), le ManLAM et le VIH-1 (**fig. 5**). Nous observons par microscopie confocale une nouvelle fois la formation de vésicules composées par le récepteur DC-SIGN et la protéine Atg9 (**fig. 5A**) décrites précédemment lors de l'engagement spécifique du récepteur par les AC (**fig. B, C**). L'incubation des DC en présence de ManLAM induit une association qui paraît statistiquement équivalente à celle générée après engagement du récepteur DC-SIGN après 15 minutes par les anticorps spécifiques, après 30 minutes bien que la moyenne (19%) soit plus élevée que celle avec les anticorps l'augmentation s'avère non significative comparé au point à 4°C (**fig. 5B**). De façon très intéressante, dès que le VIH-1 entre en contact avec les DC (30 minutes à 4°C) (**fig. 5A**), nous observons une forte colocalisation (33%) entre le récepteur DC-SIGN et la protéine Atg9 au niveau de la membrane plasmique. Après 15 et 30 minutes d'entrée du VIH-1 l'association DC-SIGN/Atg9 demeure forte, respectivement 37% et 26% (**fig. 5B**). Ces données montrent que la protéine Atg9 semble impliquée dans l'accompagnement du récepteur DC-SIGN lors de l'entrée du VIH-1 dans les cellules dendritiques. Des vésicules liées à l'autophagie semblent ainsi être formées rapidement au niveau de la membrane plasmique afin de soutenir l'acheminement du virus capturé par le récepteur DC-SIGN vers une possible dégradation lysosomale. De plus, cette association a aussi lieu dans le cadre de l'incubation des DC avec du ManLAM ce qui nous laisse penser que ce mécanisme d'autophagie pourrait s'étendre à d'autre pathogènes reconnus par le récepteur DC-SIGN par la présence d'enveloppes ou structures membranaires mannosylées tels que la bactérie *Mycobacterium Tuberculosis* ou encore le virus de la Dengue [118,123,436].

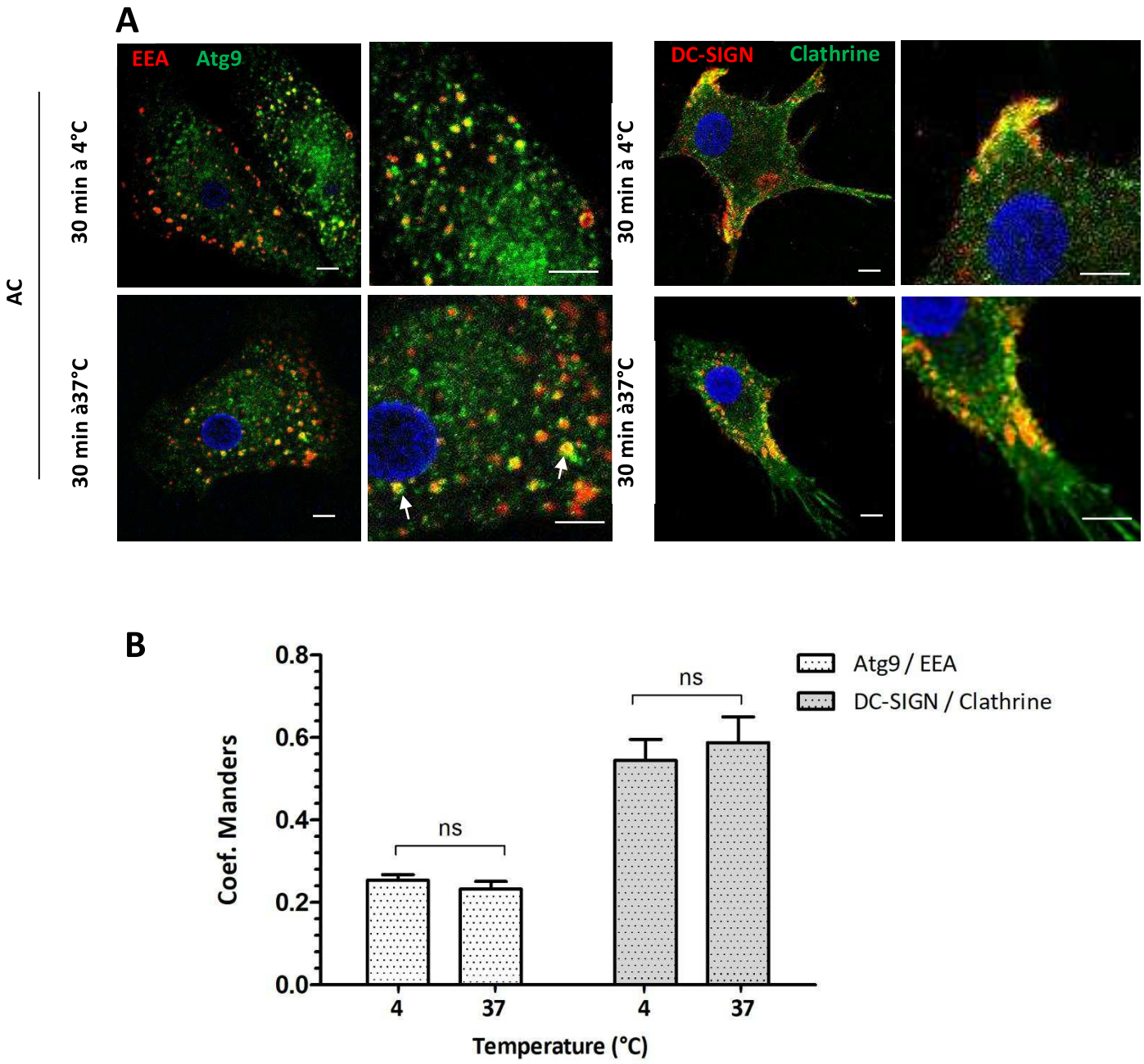


Figure 6 - Caractérisation des vésicules endocytiques formées lors de l'internalisation de DC-SIGN dans les DC

(A) L'analyse par microscopie confocale à fluorescence a été réalisée comme précédemment sur des DC traitées avec 2µg/ml de LAM au préalable durant 30 minutes à 4°C ou 37°C. Les DC ont été fixées puis marquées avec un anti-EEA1 (en rouge) et un anti-Atg9 (en vert) (panneaux de gauche). Partie droite Les marquages représentent les chaines lourdes de clathrine (en vert) et DC-SIGN (en rouge).Les noyaux ont été marqué au dapi (en bleu). **(B)** Quantification de la co-localisation d'Atg9 avec EEA et de DC-SIGN avec la clathrine analysée grâce au logiciel ImageJ (NIH), pluging JACoP avec (coef. Manders: coefficient de Manders). Les barres sont des moyennes ± s.d. de 2 expériences indépendantes, avec n=10 cellules par conditions. Barre d'échelle 5µm . Les statistiques (ns) montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les deux conditions (Mann Whitney, two-tailed).

5. CARACTERISATION DES VESICULES FORMEES LORS DE L'ENDOCYTOSE DU RECEPTEUR DC-SIGN

L'engagement du récepteur DC-SIGN par le VIH-1 induit une endocytose clathrine-dépendante [138,139] et nous avons pu confirmer que c'était aussi le cas pour l'endocytose médiée par l'engagement et l'internalisation du récepteur DC-SIGN par les AC utilisé dans notre étude (**fig. 6B**). En effet, nous observons que l'engagement du récepteur DC-SIGN par les AC induit une très forte colocalisation (54%) avec la clathrine vers les sites d'engagement récepteur DC-SIGN (**fig. 6B, images du haut**). De plus, lors de l'endocytose du récepteur après 30 minutes à 37°C la clathrine reste fortement liée au récepteur (59%) durant sa progression intracellulaire (**fig. 6B, images du bas**). La protéine Atg9 a été montrée comme étant associée aux puits de clathrine au niveau de la membrane plasmique et suivant un trafic lié aux endosomes précoces puis de recyclage [329,330]. Afin de mieux comprendre l'initiation du mécanisme de l'autophagie DC-SIGN-dépendante, nous avons souhaité mieux caractériser les vésicules d'endocytose formées lors de l'endocytose du récepteur. L'incubation des DC en présence de ManLAM 30 minutes à 4°C ou à 37°C n'induit pas d'augmentation de colocalisation (26% à 4°C et 23% à 37°C) entre le marqueur des endosomes précoces EEA-1 et la protéine Atg9 (**fig. 6A, images du haut**). En revanche les vésicules formées à 4°C sont disposées principalement en périphérie de la cellule alors qu'à 37°C elles semblent plus proches de l'espace péri-nucléaire (**fig. 6A, images du bas**). Cela pourrait témoigner de la progression des vésicules d'endocytose vers la dégradation. D'autres investigations sur les partenaires protéiques liées au transport et à la signalisation vésiculaire seront nécessaires pour déterminer le routage du récepteur DC-SIGN durant l'internalisation du VIH-1 vers la voie autophagique. Il s'avèrera nécessaire d'étudier le trafic du récepteur vis-à-vis des compartiments lysosomaux et autophagique afin de confirmer qu'Atg9 participe à l'acheminement de DC-SIGN vers la voie de dégradation autophagique.

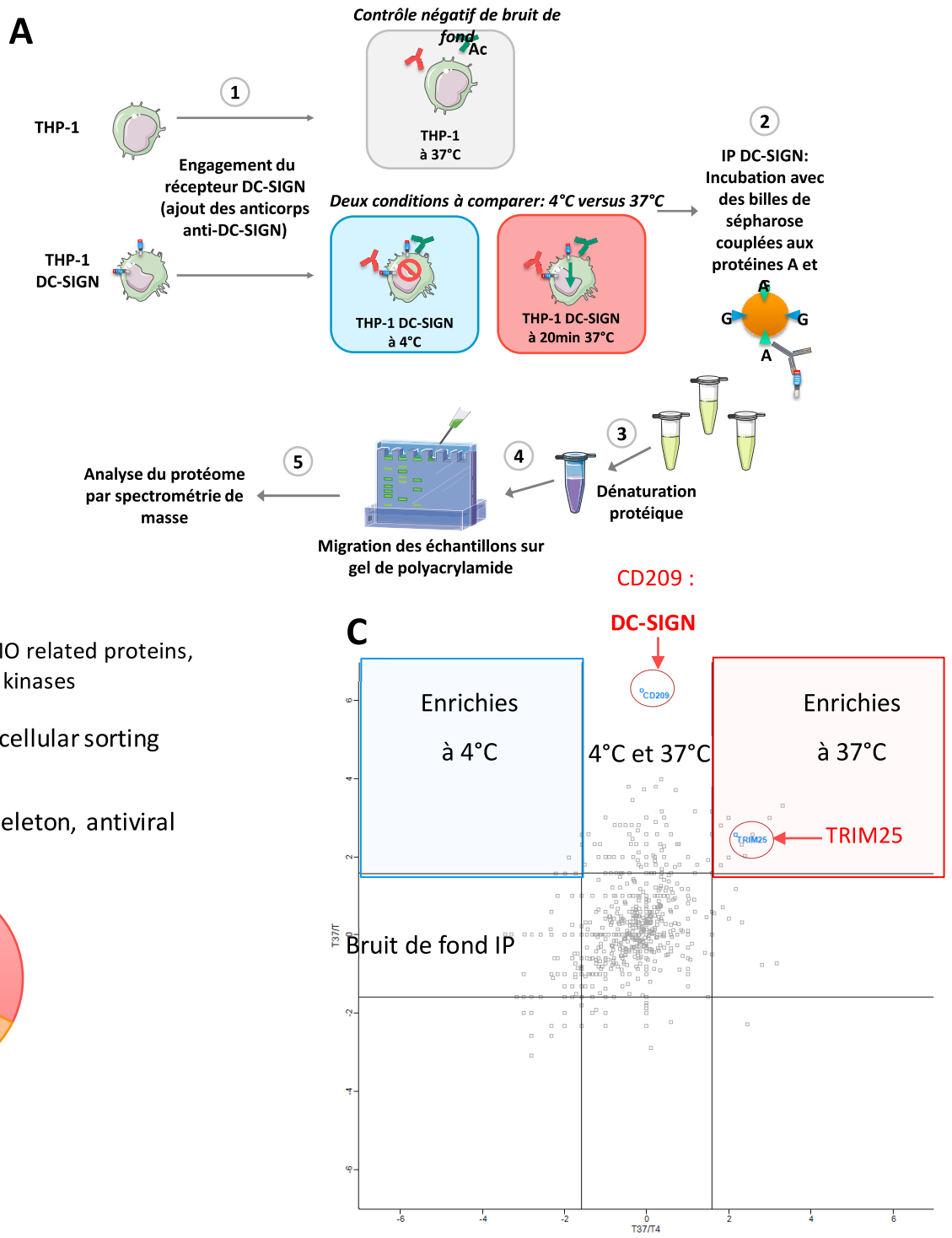


Figure 7 - Analyse du protéome de DC-SIGN par spectrométrie de masse

(A) Représentation schématique de la méthode expérimentale utilisée pour l'analyse différentielle par spectrométrie de masse. Les THP-1 (contrôle négatif) ou les THP-1 DC-SIGN ($1,5x10^7$cellules/condition) ont été engagées avec des anti-DC-SIGN suivant les temps et conditions indiqués. Les cellules ont été lysées et l'immunoprécipitation du récepteur DC-SIGN a été réalisé à partir des lysats pour les trois conditions. Les peptides générés à partir des immunoprécipitats ont ensuite été injectés dans un spectrométre de masse puis analysés. **(B)** Pourcentages de représentation des catégories protéiques majoritaires des 50 premières protéines associées significativement avec le récepteur DC-SIGN. S : sérine, T : thréonine, Y : Tyrosine **(C)** Histogramme représentant l'étude comparative du protéome du récepteur DC-SIGN engagé à 4°C ou à 37°C durant 20 minutes, par spectrométrie de masse. Dans le cadre bleu se trouvent les protéines enrichies dans la condition à 4°C et dans le cadre rouge celles à 37°C. Au milieu, les protéines retrouvées dans les deux conditions par exemple la flèche et la bulle montrent CD209 (DC-SIGN). La deuxième flèche et bulle montrent TRIM25 qui est retrouvé enrichie à 37°C avec le récepteur DC-SIGN. (n=3).

6. ANALYSE PROTEOMIQUE DE L'INTERACTOME DE DC-SIGN

Afin de mieux caractériser les partenaires protéiques associés au récepteur DC-SIGN internalisé, nous avons réalisé une analyse comparative du protéome associé au récepteur DC-SIGN. Selon la procédure expérimentale mise en place (**fig. 7A**), cette analyse protéomique a été réalisée grâce à la lignée cellulaire THP-1 transduite ou non pour exprimer DC-SIGN stablement (phénotypage en **figure 12 - annexe 1B, C**). Ainsi, après incubation des cellules avec l'AC à 4°C ou à 37°C durant 20 minutes. Les récepteurs DC-SIGN reconnus par les AC, engagés à 4°C ou internalisés à 37°C ont ensuite été immunoprécipités puis lysés et traités spécifiquement en vue de l'analyse par chromatographie en phase liquide (**fig. 7A**). L'analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) a été réalisée en collaboration avec Edith Demettre et Serge Urbach de la plateforme protéomique de Montpellier. Dans un premier temps nous avons analysé la catégorie protéique des 50 premières protéines associées de manière significative et reproductible avec le récepteur DC-SIGN, nous retrouvons une majorité de protéines liées à l'endocytose et au trafic cellulaire ainsi que des enzymes (**fig. 7B**). Concernant les enzymes trois grandes classes se distingues : 65% sont protéines apparentées ubiquitines/SUMO, 21% sont des sérine/thréonines kinases et enfin 14% sont des tyrosines kinases. D'ailleurs, la tyrosine kinase SYK été retrouvé associée significativement dans l'intéractome du récepteur DC-SIGN et nous l'avons considéré comme un facteur positif d'association avec le récepteur DC-SIGN. En effet, SYK a été rapporté par un groupe pour interagir avec le récepteur DC-SIGN [129].

De façon intéressante, l'analyse comparative du récepteur DC-SIGN engagé à 4°C et à 37°C nous a ensuite permis de discriminer les protéines majoritairement associées au récepteur à 4°C (en bleu), à 4 et 37°C (au mileu) ou encore associées au récepteur internalisé à 37°C (en rouge) (**fig. 7C**). Nous avons pu identifier 9 protéines enrichies à 37°C possédant un rôle connu jusqu'à présent dans le trafic intracellulaire et/ou dans la signalisation, telle que des enzymes liées à certaines modifications post-traductionnelles. Parmi ces 9 protéines, nous avons plus particulièrement porté notre attention sur un membre de la famille TRIM, la protéine TRIM25 (entourée en rouge) (**fig. 7C**). Cette E3 ubiquitine ligase est impliquée dans les réponses immunes antivirales [75] et d'autres membres de la famille TRIM ont été montrés comme étant impliqués dans une forme spécifique d'autophagie, l'autophagie de précision [426,432]. L'autophagie de précision repose d'une part la sur reconnaissance d'un substrat spécifique par certaine protéines de la famille des TRIM, servant alors de plateforme de recrutement pour des protéines autophagiques et notamment un membre de la famille des protéines Atg8 permettant, le recrutement du phagophore pour la dégradation du substrat [432].

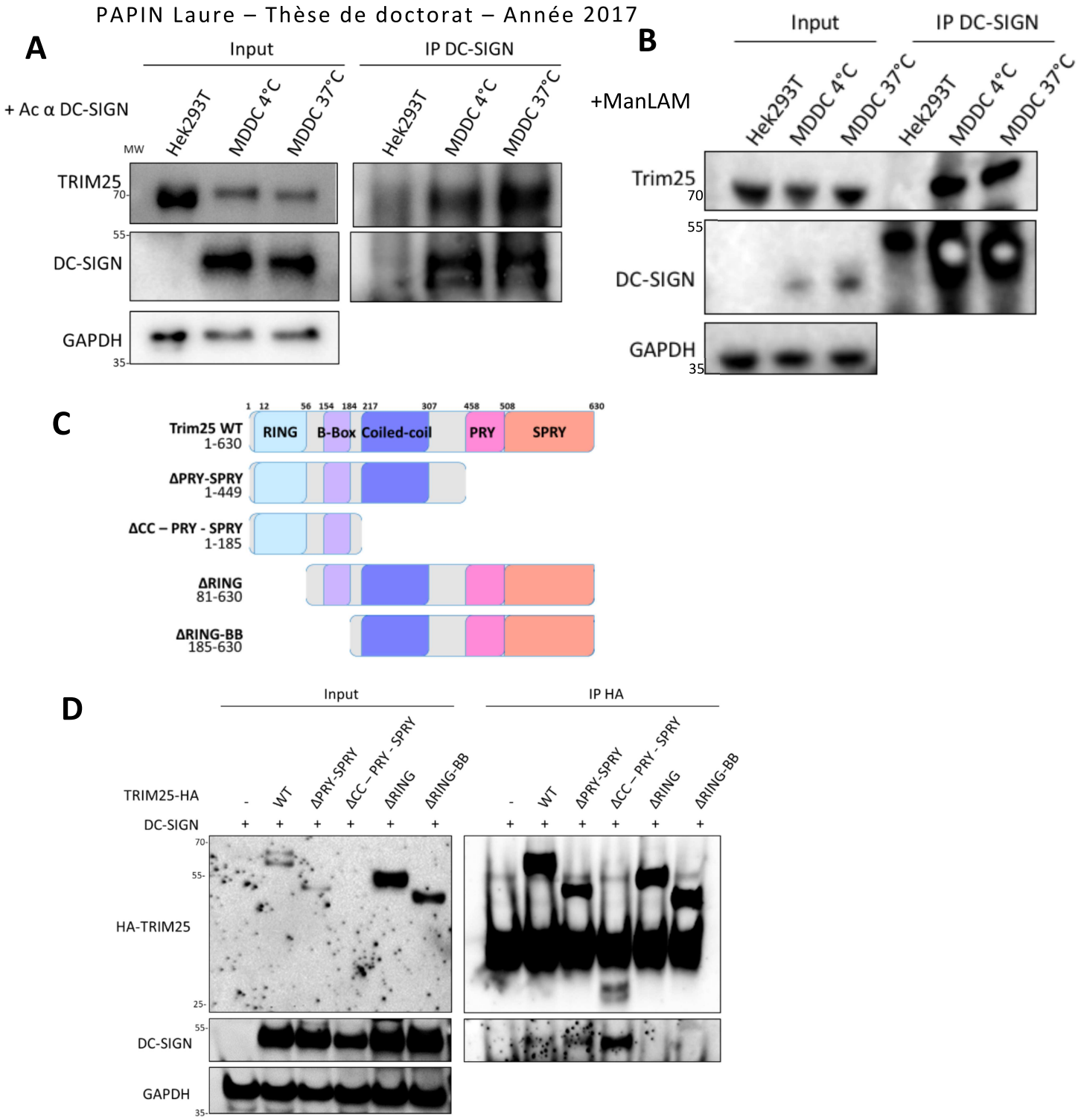


Figure 8 - L'internalisation du récepteur DC-SIGN augmente son association à TRIM25

(A) Dans les DC, le récepteur DC-SIGN a été engagé durant 30 minutes à 4°C ou à 37°C avec l'AC ou **(B)** du ManLAM, le récepteur a été immunoprécipité (IP) sur des billes de sépharose couplées aux protéines A et G, puis la co-immunoprécipitation a été analysée par western blot. Le contrôle négatif étant des cellules Hek293T n'exprimant pas DC-SIGN en présence d'anticorps anti-DC-SIGN. La co-IP a été analysée avec un anticorps anti-DC-SIGN (44kDa), anti-Trim25 (71kDa) et anti-GAPDH (37kDa) (n=5 issu de 5 donneurs indépendants). **(C)** Représentation schématique de TRIM25 sauvage (WT) des mutants de délétion. **(D)** Des cellules HEK293T ont été transfectées avec les constructions plasmidiques indiquéesA partir des lysats cellulaires, les IP Trim25 ont été réalisées avec des anti-HA couplés sur des billes de sépharose / protéines A et G. Les révélations par WB ont été faites avec anti-DC-SIGN, anti-HA et anti-GAPDH. Ce résultat est représentatif de 3 expériences indépendantes (n=3).

7. LE RECEPTEUR DC-SIGN S'ASSOCIE A LA PROTEINE TRIM25

Afin de confirmer cette interaction, nous avons réalisé à des expériences d'immunoprécipitation du récepteur DC-SIGN ou de la protéine TRIM25, exprimés de manière endogène ou exogène. Dans un premier temps, nous avons d'abord validé l'association entre DC-SIGN et TRIM25 exprimés de manière endogène dans les DC (**fig. 8A**). Lors de l'incubation des DC avec des AC 30 minutes à 4 ou à 37°C, nous observons que TRIM25 interagit avec le récepteur DC-SIGN à 4°C et est enrichi à 37°C (**fig. 8A**), en accord avec les résultats issus de l'analyse comparative protéomique (**fig. 7C**). L'association DC-SIGN / TRIM25 a aussi été confirmée dans les DC lorsque les cellules sont incubées en présence de ManLAM, néanmoins avec ce ligand il ne semble pas que la protéine TRIM25 soit enrichie à 37°C (**fig. 8B**). Ces résultats suggèrent que l'E3 ubiquitine ligase TRIM25 pourrait être recrutée lors de l'endocytose du récepteur. Nous confirmons aussi cette interaction dans les cellules HEK293T co-transfectées avec des plasmides exprimant le récepteur DC-SIGN WT et la protéine TRIM25 (étiqueté avec HA) TRIM25-HA (**fig. 8D**). Afin de connaître le domaine de TRIM25 impliqué dans l'interaction avec le récepteur DC-SIGN et l'impact de la délétion d'un ou plusieurs motifs présents dans la protéine TRIM25 (**fig. 8C**), nous avons surexprimé chacune des constructions WT et délétées (toutes étiquetés avec un peptide HA en C-terminal) indépendamment ainsi que le récepteur DC-SIGN WT dans des cellules HEK293T puis nous avons immunoprécipité la protéine TRIM25 (**fig. 8D**). Nous constatons que seules les constructions qui possèdent le motif RING interagissent avec le récepteur DC-SIGN (**fig. 8D**). De façon intéressante, le récepteur DC-SIGN interagit plus avec le mutant ΔCC-PRY-SPRY composé uniquement des domaines RING et B-BOX en N-terminal comparé à la protéine TRIM25 WT ainsi que la protéine TRIM25 ΔPRY-SPRY.

Cela souligne l'importance du domaine RING pour la formation du complexe DC-SIGN/TRIM25 et suggère une potentielle implication de l'activité E3 ubiquitine ligase de TRIM25 dans cette association étant donné que cette activité réside justement dans ce motif RING (**fig. 8D**).

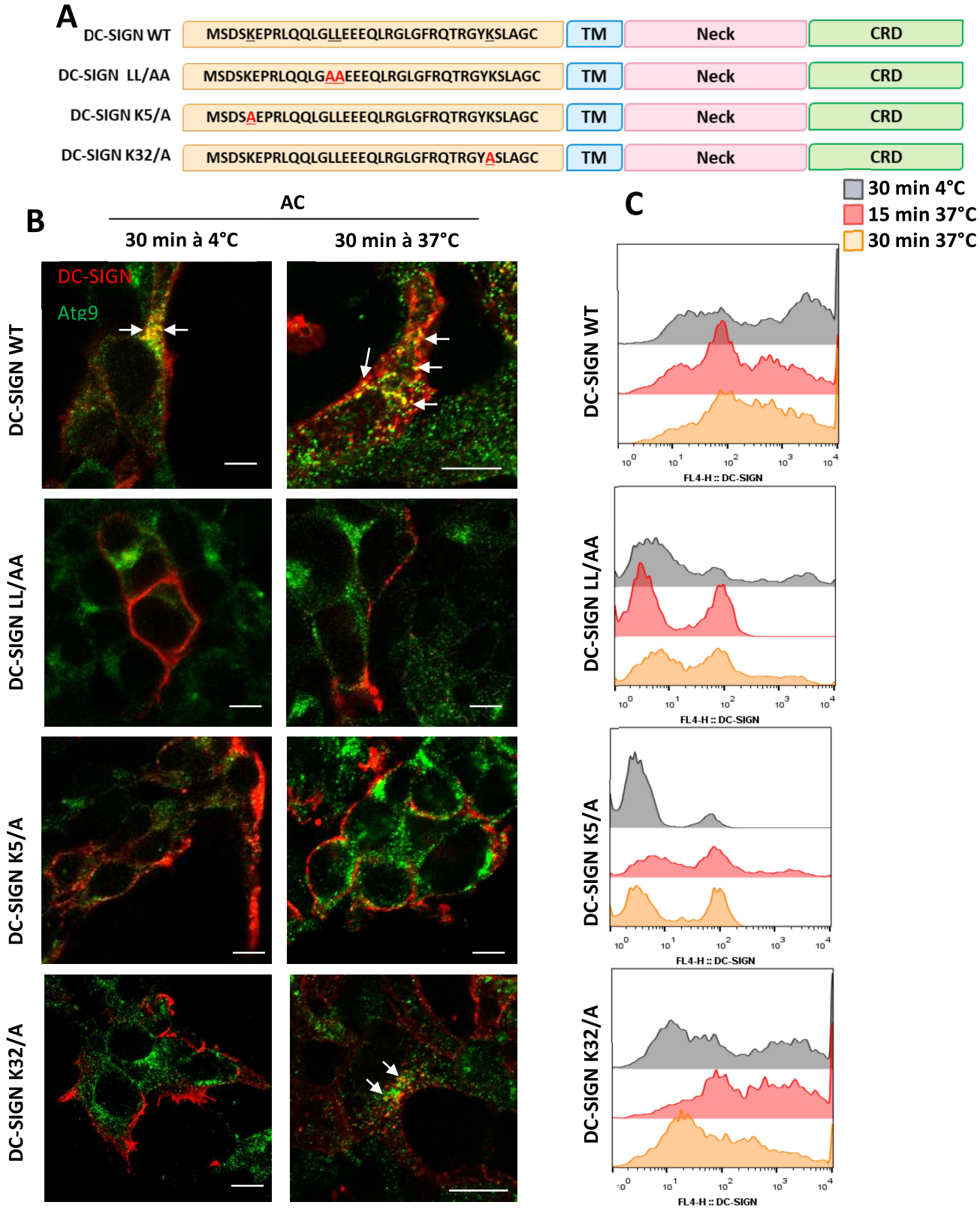


Figure 9 - Certain motifs et résidus cytosoliques du récepteur DC-SIGN sont impliqués dans le recrutement d'Atg9 lors de l'endocytose du récepteur DC-SIGN

(A) Représentation schématique des récepteurs DC-SIGN WT (sauvage) et mutants LL/AA, K5/A, K23/A. Des cellules HeLa ont été transfectées avec les différentes constructions comme indiqué puis ont été incubé avec l'AC 30 minutes à 4°C ou 37°C ou 15 minutes à 37°C. Une fois engagé le récepteur DC-SIGN a été **(B)** immunomarqué ainsi que la protéine Atg9 (endogène) puis analysé en microscopie confocale (n=3), (**C**) suivit en cytométrie en flux, les cytogrammes sont représentatifs des cinétiques d'internalisation du récepteur dans les différents modèles cellulaires indiqués (n=3). En abscisses sont représentées les intensités de fluorescence d'expression de DC-SIGN et en ordonnées le nombre de cellules acquises. Barre d'échelle 5µm.

8. CERTAIN MOTIFS OU RESIDUS CYTOSOLIQUES DU RECEPTEUR DC-SIGN SONT IMPLIQUES DANS LE RECRUTEMENT D'ATG9

Suite à la découverte de l'interaction DC-SIGN/TRIM25 via le motif RING, suggérant que l'activité E3 ligase de TRIM25 pourrait être impliquée dans la virophagie anti-VIH-1, nous avons émis l'hypothèse que le récepteur DC-SIGN lui-même pourrait être ubiquininylé. En effet, l'ubiquitination est une modification post-traductionnelle pouvant être impliquée dans le routage du récepteur et dans la signalisation et le tri de vésicules endocytiques [437]. Les modifications post-traductionnelles sont aussi connues comme étant cruciales pour la signalisation cellulaire mais aussi pour la dégradation de cibles protéiques [363]. L'ubiquitination est aussi impliquée dans une forme spécifique d'autophagie : l'autophagie sélective [371]. L'ubiquitination s'opérant sur des résidus lysine de protéines cibles, nous avons généré deux nouveaux mutants du récepteur DC-SIGN dont les résidus lysine (K) en position 5 et 32 ont été remplacés par des résidus alanine (A) (DC-SIGN K5/A et DC-SIGN K32/A) (**fig. 9A**). Après transfection de cellules HeLa, nous avons comparé le profil d'internalisation de ces récepteurs mutés à celui du récepteur sauvage (WT) ou de récepteurs mutés sur une séquence di-leucine défectif pour l'internalisation (LL/AA) (**fig. 1A**). Nos résultats obtenus en cytométrie en flux (**fig. 9C**) et en microscopie confocale (**fig. 9B**) montrent que la mutation en position 5 semble affecter la capacité du récepteur à être internalisé puisque celui-ci, tout comme le récepteur muté sur le motif dileucine, est principalement retrouvé en surface cellulaire à 4 et 37°C bien que formant des clusers comme le récepteur WT (**fig. 9B, C**). Nous avons aussi analysé l'impact de ces mutations sur les résidus lysine intracytoplasmique du récepteur DC-SIGN sur le recrutement de la protéine Atg9 démontré précédemment (**fig. 3, 4, 5**). Pour cela nous avons co-marqué le récepteur DC-SIGN engagé à 4°C et internalisé à 37°C avec la protéine Atg9 exprimée de façon endogène (**fig. 9B**). De façon très interessante, nous observons alors que les récepteurs mutés sur le motif dileucine ou sur le motif lysine en position 5 présentant un défaut d'endocytose ne permettent plus le récrutement de la protéine Atg9 (**fig. 9B**). Quant aux récepteurs mutés sur la lysine en position 32, ils semblent pouvoir être internalisé mais de façon légèrement retardée comparé au récepteur WT (**fig. 9C**) et semble pouvoir s'associer avec la protéine Atg9 mais de façon plus modérée que le récpetur WT.

Ces données prometteuses démontrent l'importance des résidus lysine présents dans la région intracellulaire du récepteur pour l'endocytose pour le routage du récepteur et suggèrent par conséquent la potentielle implication de modifications post-traductionnelles pour le tri post-endocytique du récepteur une fois internalisé. Enfin, ces données suggèrent aussi que l'association entre le récepteur DC-SIGN et la protéine Atg9 requiert des capacités endocytiques fonctionnelles du récepteur DC-SIGN.

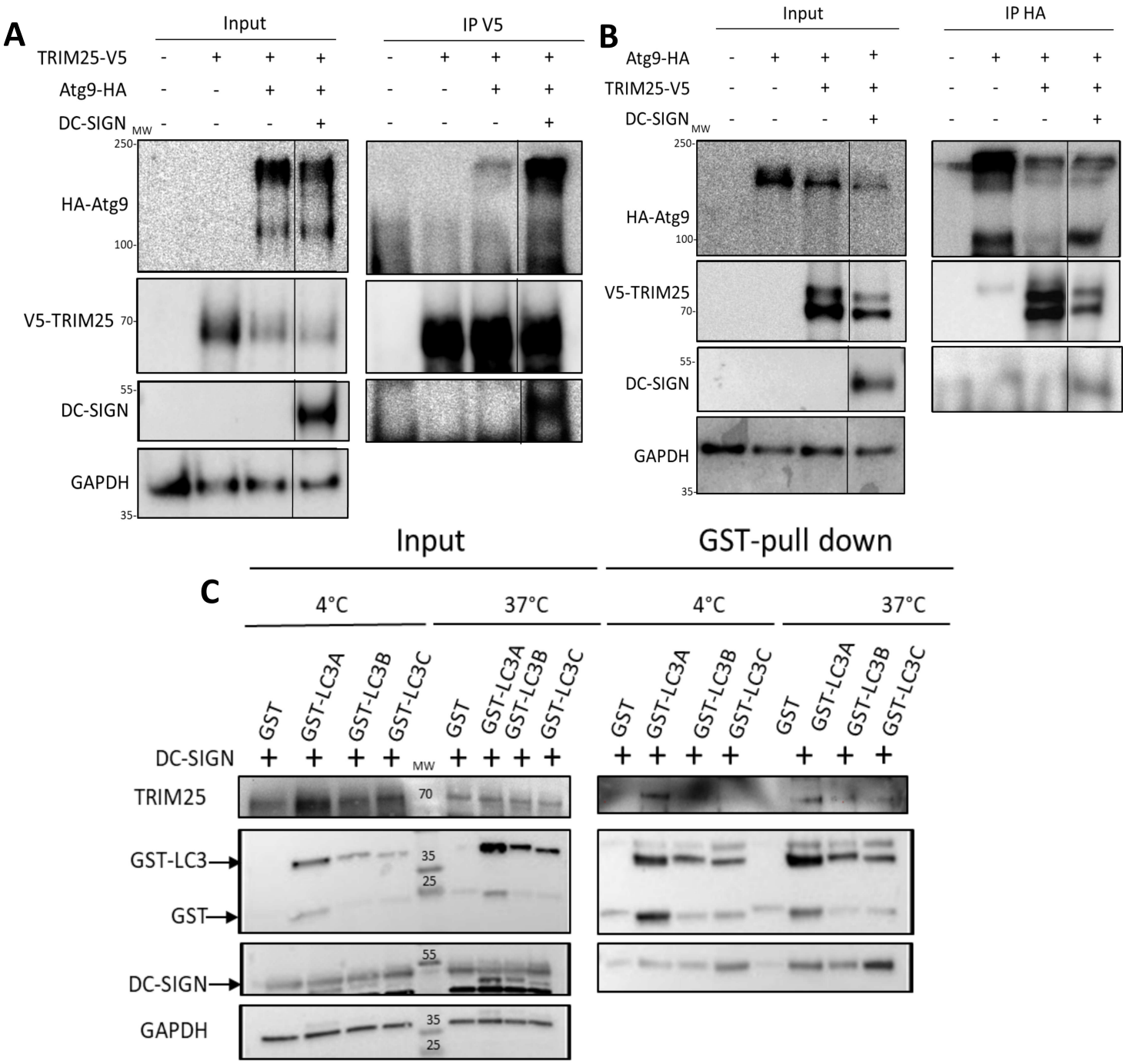


Figure 10 - Les protéines Atg9, Trim25, LC3 et DC-SIGN forment un complexe de type TRIMosome

(A) et **(B)** Les cellules HEK293T ont été transfectées comme indiqué avec les plasmides Trim25-V5, Atg9-HA, DC-SIGN. (A) les IP V5 ou (B) HA ont été réalisées. Les révélations par immunoblot ont été faites avec anti-DC-SIGN, anti-HA, anti-V5 et anti-GAPDH (37 kDa). **(C)** Les cellules HEK293T ont été transfectées comme indiqué avec les plasmides LC3A-GST (40-43 kDa), LC3B-GST (40-43 kDa), LC3C-GST (40-43 kDa), GST-vide (25 kDa) et DC-SIGN (44 kDa). Après engagement du récepteur DC-SIGN durant 30 minutes à 4°C ou 37°C les cellules ont été lysées. Les lysats ont été soumis à un GST-pull down avant d'être soumis à électrophorèse et révélés par western blot à l'aide d'anticorps anti-DC-SIGN, anti-Trim25, anti-GST et anti-GAPDH. Ces résultats sont représentatifs de 3 expérimentations indépendantes (n=3).

9. Un complexe est forme entre le recepteur DC-SIGN, la proteine Atg9, l'E3 ligase TRIM25 ainsi que les proteines de la famille LC3

Dans l'hypothèse d'une autophagie antivirale générée par le récepteur DC-SIGN, nous avons précédemment décrit les associations entre d'une part, la protéine autophagique Atg9 et le récepteur DC-SIGN (**fig. 3, 4, 5**) et d'autre part par l'E3 ligase TRIM25 et le récepteur DC-SIGN en condition endogène dans les MDDC (**fig. 8A, B**), dans les THP-1 DC-SIGN (**fig. 7C**) et dans les HEK293T en condition de surexpression (**fig. 8D**). Afin de savoir si ces protéines pouvaient former un complexe de type TRIMosome pour ensuite connaitre l'impact de ce complexe sur la dégradation du VIH-1 par autophagie. Nous avons, d'une part, nous avons réalisé une immunoprécipitation de la protéine TRIM25 (étiqué V5) en présence ou non du récepteur DC-SIGN et de la protéine Atg9 (étiqueté avec HA) Atg9-HA comme indiqué (**fig. 10B**) et d'autre part une immunoprécipitation de la protéine Atg9-HA en présence ou non du récepteur DC-SIGN et de la protéine TRIM25-V5 (**fig. 10A**). À l'issu de ces expérimentations, nous observons que les protéines DC-SIGN et Atg9-HA se retrouvent co-immunoprécipitées avec TRIM25-V5 (**fig. 10A**) et les protéines DC-SIGN et TRIM25-V5 sont aussi retrouvées co-immunoprécipitées avec Atg9-HA (**fig. 10B**). Ainsi l'ensemble de ces résultats, montrent que les trois protéines DC-SIGN, TRIM25 et Atg9 forment un complexe en condition de surexpression dans les cellules HEK293T. De manière inattendue, nous observons aussi que les protéines TRIM25 et Atg9 interagissent entre elles, signifiant que leur association peut être indépendante du récepteur DC-SIGN (**fig. 9 A, B**).

D'autre part, étant donné que nous montrons que l'engagement du récepteur DC-SIGN par différents ligands induit l'autophagie (augmentation de LC3-II) (**fig. 2**), nous avons ensuite voulu testé l'interaction entre DC-SIGN et certaines protéines de la famille Atg8 dont les isoformes LC3-A, B et C. Pour cela nous avons co-transfecté des cellules HEK293T avec des plasmides exprimant le récepteur DC-SIGN WT et les protéines LC3-A, B et C (étiqueté GST) ou la protéine GST-vide comme contrôle négatif (**fig. 10C**). Suite à cela, le récepteur DC-SIGN a été engagé à l'aide de l'AC durant 30 minutes à 4 ou à 37°C puis les lysats ont été soumis à un « GST pulldown » afin de précipiter toutes les constructions GST à l'aide de billes de sépharose couplées au glutathion. Ces expériences montrent que le récepteur DC-SIGN se retrouve associé avec les trois isoformes A, B et C de LC3 testées dans cette expérience de GST-pull down (**fig. 10C**) avec une association qui semble préférentielle avec l'isoforme LC3-C. Enfin, nous observons que la protéine TRIM25 endogène s'associe aussi avec les trois isoformes de LC3 testées à 37°C et préférentiellement avec les formes A et B à 4°C (**fig. 10C**).

Cette étude nous permet de conclure qu'un complexe se forme entre DC-SIGN, Atg9, TRIM25 et les protéines de la famille LC3 dans les cellules HEK293T en condition de surexpression (**fig. 11**).

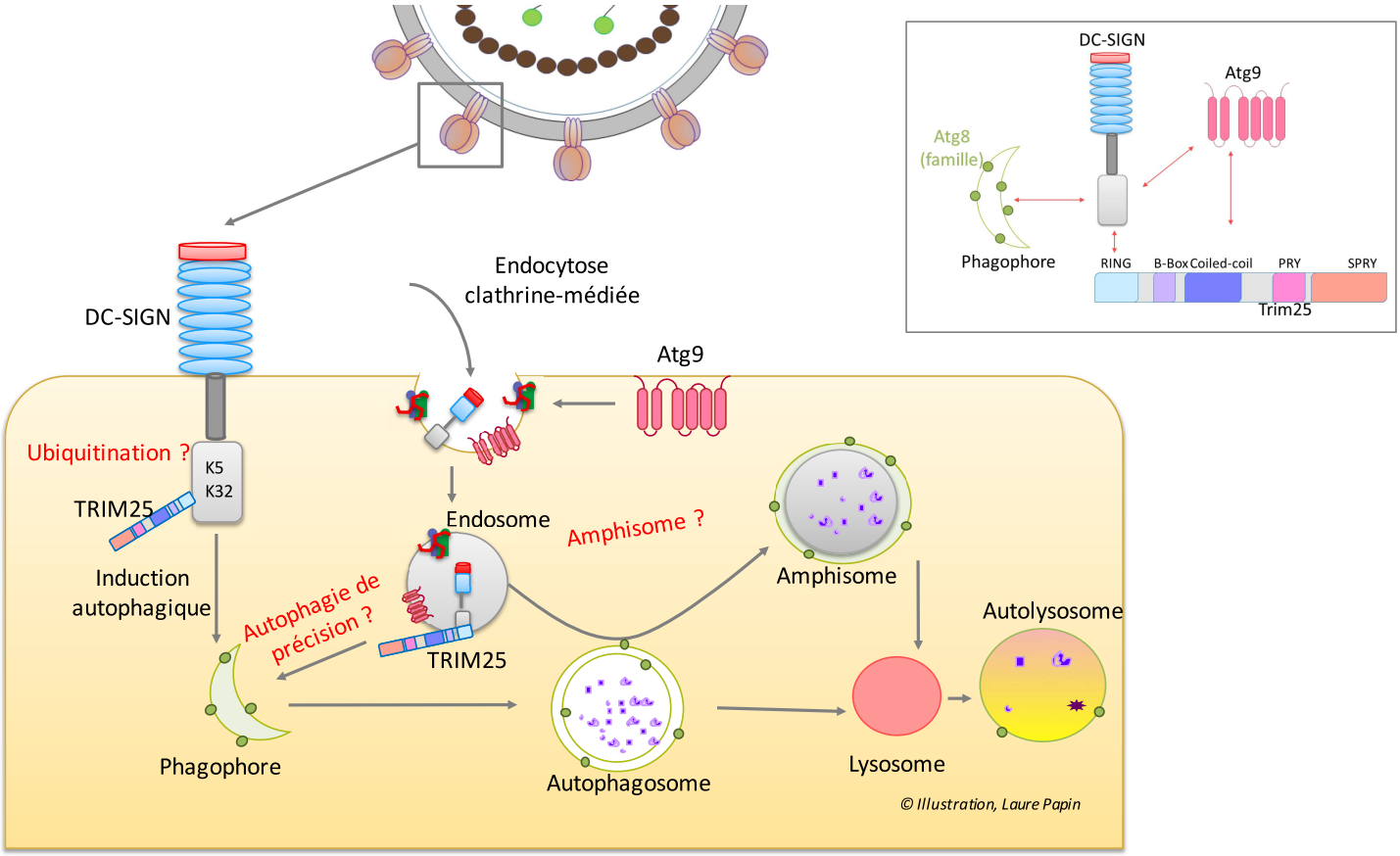


Figure 11 - L'internalisation du récepteur DC-SIGN induit la formation d'un complexe Atg9-Trim25-LC3-DC-SIGN

Une fois engagé le récepteur DC-SIGN recrute la protéine Atg9 et ces deux protéines sont retrouvés dans des vésicules de type endosome précoce Atg9+, DC-SIGN+, EEA1+, clathrine+. Le recrutement d'Atg9 est dépendant des capacités endocytiques du récepteur DC-SIGN et des modifications post-traductionnelles s'opérant directement sur le récepteur DC-SIGN pourraient être importantes pour le routage du récepteur vers la virophagie anti-VIH-1. L'internalisation du récepteur DC-SIGN induit l'autophagie et induit le recrutement de TRIM25 qui intéragit avec le récepteur DC-SIGN via le domaine RING de TRIM25. Cela renforce l'idée d'une autophagie sélective et finement régulé. Enfin, Atg9-Trim25-LC3-DC-SIGN forment un complexe qui devrait rejoindre les autophagosomes déjà décrit dans les DC comme permettant la dégradation du VIH et favorisant les réponses immunaires innées et adaptatives.

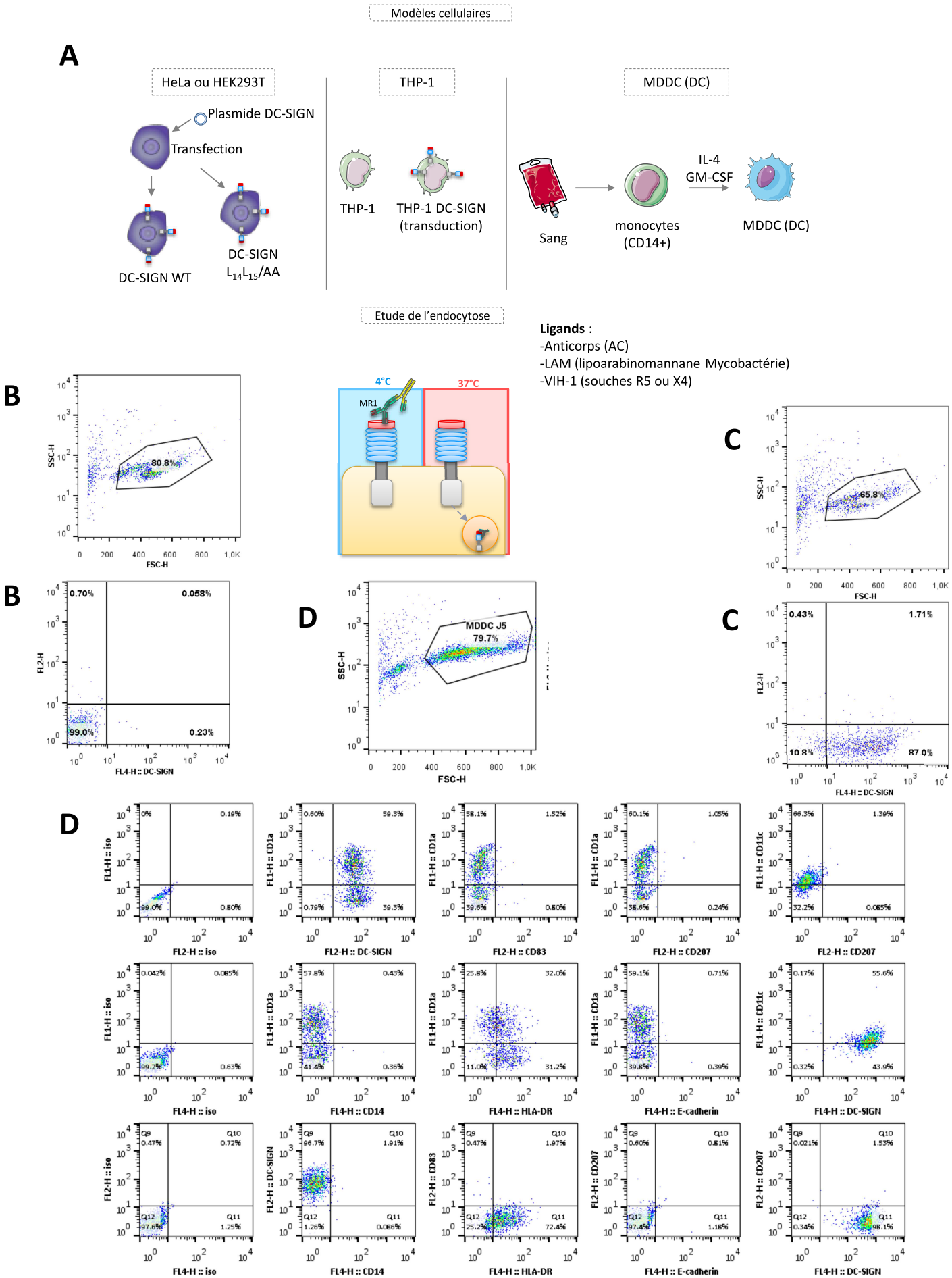


Figure 12 – annexes :

(A) Représentation schématique de la procédure d'engagement et d'internalisation du récepteur DC-SIGN par différents ligands dans différents modèles cellulaires. **(B)** Phénotypage des THP-1 parentales **(C)** des THP-1 DC-SIGN transduites stablement **(D)** Phénotypage par cytométrie en flux des MDDC (J+5), données représentatives de données issues de 23 donneurs sains.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. MODELE D'ETUDE DE L'ENTREE DU VIH-1 DANS LES CELLULES DENDRITIQUES : LE RECEPTEUR DC-SIGN

La mise en place de modèles d'étude de l'internalisation du récepteur DC-SIGN a constitué une première étape primordiale afin de vérifier mon hypothèse de travail sur l'existence d'un lien entre l'entrée DC-SIGN médiée et la voie de dégradation autophagique (**illustration 26**). En effet, nous émettons l'hypothèse que la mise en place de l'autophagie anti-VIH-1, décrite par plusieurs équipes, pourrait notamment dépendre dans les DC d'un signal spécifique issu du récepteur DC-SIGN, ou d'un complexe protéique associé lors de son engagement. Durant mon projet de thèse, nous avons développé différents modèles cellulaires allant des cellules dendritiques dérivées de monocytes humains primaires (MDDC, appelées DC dans la partie résultats) exprimant le récepteur DC-SIGN de manière endogène et jusqu'à des lignées cellulaires d'origine myéloide (THP1) ou non (HEK293T, HeLa) permettant d'exprimer le récepteur DC-SIGN de manière exogène (**fig. 1A, B, C**). Notamment, la mise en place de ces modèles cellulaires s'est avérée utile pour comparer l'internalisation et la signalisation générée par un récepteur sauvage et des récepteurs mutants (**fig. 1A, B, 9B, C**). En effet, certains récepteurs mutants précédemment décrits[117], représentent des contrôles négatifs d'endocytose. Par exemple, comme le mutant dileucine DC-SIGN LL/AA puisque la sous-unité μ2 du complexe adaptateur de clathrine AP2 ne peut plus s'y associer [438] (**fig. 1A, B, 9B, C**). Les modèles cellulaires mis en place ont été décrits comme opérationnels pour l'étude de l'internalisation du récepteur par des anticorps monoclonaux dirigés contre la partie CRD (domaine de reconnaissance des sucres) du récepteur (**fig. 1A, B**). De par leur quantité non limitante, leur capacité à être aisément transfectables et leur capacité à exprimer une grande quantité de récepteurs à la surface cellulaire, les lignées cellulaires (HEK293T, HeLa, THP-1 DC-SIGN) se sont avérées nécessaires dans le cadre d'analyses biochimiques du récepteur DC-SIGN (**fig. 7, 8, 10**). En effet, la caractérisation du protéome du récepteur DC-SIGN (internalisé ou non) et la mise en évidence des facteurs cellulaires régulant l'adressage du récepteur après engagement ont demandé d'importantes quantités de cellules et de récepteurs exprimés de façon homogène (**fig. 7**). L'évaluation de l'internalisation du récepteur DC-SIGN par des AC, par du ManLAM qui est le composant majoritaire de la paroi mycobactérienne (lipoglycane poly-mannosylé) [123,436] ou encore par le VIH-1 (souches R5 et X4) a été effectuée par cytométrie en flux (**fig. 1C**) et par différentes techniques de microscopie (**fig. 1C, 4, 5**). En TEM, nous observons que le récepteur se situe dans une vésicule cytoplasmique après 30 minutes d'internalisation par des AC la résolution de la structure membranaire est faible en conséquence du traitement effectué pour l'immunomarquage effectué (**fig. 1E**). Le ManLAM et le VIH-1 ne sont pas spécifiques du récepteur DC-SIGN, d'autres récepteurs ou CLR peuvent reconnaître ces ligands [123,134,185]. C'est pourquoi nous avons aussi choisi d'utiliser des anticorps dirigés contre DC-SIGN qui ne sont pas des agonistes naturels mais qui permettent de cibler

spécifiquement le récepteur. L'internalisation du récepteur DC-SIGN dans les DC par le VIH-1 semble moins efficace en cytométrie en flux comparé aux anticorps anti-DC-SIGN ou au ManLAM certainement dû au fait que le VIH-1 peut être reconnu et internalisé par de nombreux récepteurs lectine de type C (CLR) ainsi que par le récepteur CD4 et corécepteurs exprimés à la surface des DC (chapitre C.6.2, tableau 5) (**fig. 1C**). Le ManLAM peut aussi être reconnu par différents CLR ce qui pourrait influer sur les niveaux d'endocytose du récepteur DC-SIGN (**fig. 1C**).

2. L'ENGAGEMENT DU RECEPTEUR DC-SIGN INDUIT L'AUTOPHAGIE

Des cinétiques d'internalisation du récepteur DC-SIGN ont été réalisées dans les DC avec les trois ligands du récepteur décrit précédemment (**figure 12 - annexe 1A**) afin de déterminer si la signalisation engendrée par l'engagement et/ou l'endocytose du récepteur pouvait moduler l'autophagie. Bien que statistiquement non significative, une augmentation rapide de la protéine LC3-II induite par le ManLAM peut être observée dans les DC suggérant une modulation du flux autophagique par ce lipoglycane (**fig. 2B**). L'effet observé (observable dès 30 minutes d'exposition) de façon reproductible tend vers la significativité mais nécessiterait plus d'expériences pour que cela soit statistiquement validé (**fig. 2B**). Toutefois, le ManLAM n'étant pas spécifique du récepteur DC-SIGN, d'autres récepteurs et CLR peuvent reconnaître ce genre de ligand [123,185,436]. Aussi, l'expression de ces CLR ou récepteurs peuvent varier en fonction de la différenciation des DC (à partir de monocytes) mais aussi de leur maturation [439]. Par exemple, le mannose récepteur (MR), Dectin-2 mais aussi les complexes TLR-2/TLR-1 associés à CD14 pourraient reconnaître le ManLAM et masquer ou limiter l'effet de l'induction du flux autophagique par le récepteur DC-SIGN. En effet, les signalisations induites à partir de ces récepteurs ou complexes de surface ont été démontrés comme pro-inflammatoires [440] et pouvant induire plutôt un effet antagoniste sur la voie autophagique.

En outre, en comparant le niveau de LC3-II des cellules mises en contact avec le sérum de souris (**fig. 2D**) et celui des cellules mises en contact avec l'anticorps monoclonal dirigé contre DC-SIGN (**fig. 2A**) nous pouvons valider que l'effet obtenu par l'AC est bien induit par le récepteur et non pas dû à un effet alterne comme par exemple l'enclenchement de voies de phagocytose via la reconnaissance par les récepteurs Fc. Par ailleurs, nous observons que la cinétique d'internalisation du récepteur DC-SIGN présente un profil similaire qu'il soit engagé par des AC ou par le VIH-1 (**fig. 2A, C**). Etant donné que nous avons précédemment vérifié que l'anticorps induit l'endocytose de DC-SIGN et que la cinétique d'internalisation dépendante du VIH-1 présente un profil similaire, cela nous permet d'envisager que des voies ou signaux similaires pourraient être générés. De plus, l'augmentation significative de la protéine LC3-II après 30 minutes, 1h et 3h d'incubation par les AC ou le VIH-1, montre que

l'engagement du récepteur peut générer un signal suffisant pour induire l'augmentation de LC3-II qui représente un marqueur du flux autophagique (**fig. 2A, C**).

La caractérisation de l'effet sur le flux autophagique passe souvent par des expériences impliquant des réactifs pharmacologiques notamment capables de bloquer les étapes tardives du flux. En effet, l'augmentation de LC3-II peut traduire soit une induction du flux autophagique (accumulation d'autophagosomes à un instant T sans altération de la dégradation lysosomale) soit au contraire un blocage dans les étapes tardives du flux (le blocage de la dégradation lysosomale aboutit à une accumulation de LC3-II qui n'est plus dégradé). Nos expériences réalisées dans les DC en présence de chloroquine qui permet de bloquer efficacement la dégradation lysosomale (**fig.2**), nous ont permis d'observer une très forte et très rapide accumulation de protéine LC3-II avec tous les ligands utilisés (**fig. 2A, B, C**) ce qui confirme un flux autophagique extrêmement dynamique dans les DC. En revanche, cette accumulation saturante très rapide de la protéine LC3-II ne permet pas de distinguer une différence significative de modulation du flux autophagique entre le point sans ligands (0 minute + Chlq) et les points pour lesquels le récepteur a été engagé et internalisé (30 minutes et 1h) en présence de chloroquine (**fig. 2A, B, C**).

Nos données suggèrent donc une induction très rapide du flux autophagique après engagement du récepteur DC-SIGN mais de nouvelles cinétiques devront être réalisées en utilisant d'autres inhibiteurs des étapes tardives du flux autophagique, comme par exemple des inhibiteurs spécifiques des cathepsines lysosomales (E64D, pepstatine) ou encore de la bafilomycine A1 qui est un inhibiteur de l'ATPase vacuolaire (V-ATPase) responsable de l'acidification vésiculaire [324]. Aussi, le suivi par western blot de récepteurs autophagiques (SLR) tels que sequestosome1/p62 pourra se révéler intéressant afin de clairement valider que l'internalisation du récepteur DC-SIGN induit le flux autophagique et non pas un blocage des étapes tardives de l'autophagie. En effet, ces récepteurs autophagiques sont dégradés lors du flux autophagique. Ainsi, des cinétiques d'internalisation du récepteur DC-SIGN sont prévues pour comparer dans les DC les niveaux de LC3-II et de p62 qui représentent différents cadres de lecture du flux autophagique [324]. Par ailleurs, mon laboratoire a précédemment montré que lors de la déplétion (siRNA) de certaines protéines cruciales pour l'autophagie (Atg5, LC3), après 20h d'infection par le VIH-1, les DC transfèrent (*trans*-infection) plus de virions aux LT $CD4^+$ et présentent une diminution des réponses innées et adaptatives [158]. Ainsi, dans les perspectives à court-terme, il sera intéressant de réaliser des expériences de silencing (par siRNA) de certains facteurs clés de l'autophagie afin d'étudier l'impact de l'internalisation du récepteur DC-SIGN sur l'induction de cette voie DC-SIGN-dépendante. Cela nous permettra, notamment, de déterminer si l'autophagie induite très rapidement par le récepteur DC-SIGN est reliée ou non à l'autophagie dite canonique ou si c'est une forme d'autophagie sélective non-canonique associée au récepteur. Enfin, l'impact de la déplétion

protéique (siRNA) de certains acteurs majeurs de la voie autophagique sera aussi analysée sur la dégradation virale (quantification de p24) et la transmission de l'infection (co-culture avec des LT $CD4^+$) à partir de DC mises en contact avec le VIH-1, lors la cinétique d'internalisation du récepteur DC-SIGN. Ces perspectives expérimentales nous aideront à mieux caractériser les mécanismes dépendant de l'autophagie mis en place lors de la dégradation du VIH-1 dans les DC.

Nous avons vu précédemment dans l'introduction de mon manuscrit (chapitre D.11.1) que la signalisation de certains récepteurs de reconnaissance de pathogènes (PRR) pouvait moduler la voie autophagique après reconnaissance de pathogènes tel que TLR-4 [385,389], NOD2 [72] ou encore RIG-I [394]. Actuellement, seules trois études récentes permettent de faire le lien entre l'action d'un récepteur CLR et l'autophagie : les travaux réalisés précédemment par mon équipe [158] (voir le chapitre initulé contexte scientifique), les travaux menés par le Docteur Wang et ses collaborateurs [431] (chapitre d'introduction D.12.3) et enfin les travaux menés par l'équipe du Docteur Geijtenbeek [131] (chapitre d'introduction D.10.4 et D.11.1.4).

3. Le recepteur DC-SIGN induit le recrutement de la proteine Atg9 durant son endocytose

Mes résultats de thèse montrent que l'engagement du récepteur DC-SIGN induit le recrutement de la protéine Atg9 proche de la membrane plasmique (**fig. 3A, 4B, C, 5A**). Lors de l'engagement du récepteur durant 30 minutes à 4°C par des AC nous montrons que DC-SIGN et Atg9 sont déjà très proches (83 nm) en microscopie électronique (**fig. 4A**), forment des complexes d'environ 0,4µm de diamètre directement à la membrane plasmique en microscopie STED (**fig. 4B**) et sont retrouvés colocalisées (3,5% AC, 8% ManLAM et 36% VIH-1) (**fig. 5B**). Cela suggère que ces deux protéines pourraient s'associer directement à la membrane plasmique et partager la même voie d'endocytose.

Cette hypothèse est d'ailleurs renforcée par le fait qu'après 30 minutes d'internalisation à 37°C, le récepteur DC-SIGN internalisé et Atg9 se retrouvent fortement associés (15% AC, 21% ManLAM et 26% VIH-1) (**fig. 5**), très proches (105 nm de distance) (**fig. 4A**) dans des vésicules de 10 µm de diamètre (**fig. 4B**). Enfin, bien que les profils d'induction d'autophagie en western blot dans les DC soient similaires lors de l'incubation des DC avec les AC ou le VIH-1 (**fig. 2A et C**), lorsque l'on compare les quantifications de colocalisation en microscopie confocale entre DC-SIGN et Atg9 dans ces deux conditions, on s'aperçoit que la mise en contact des DC avec le VIH-1 induit plus rapidement le recrutement d'Atg9 à la membrane plasmique (**fig. 5A et B**). Cela peut s'expliquer par le fait que la particule virale entière peut se fixer (via Env) de façon optimale au récepteur DC-SIGN comparé aux anticorps ou au ManLAM et permettre de générer des « microclusters » fortement associés au

cytosquelette [114]. En effet, la tétramérisation de DC-SIGN est particulièrement importante pour l'optimisation de l'attachement des ligands, notamment lors de la reconnaissance des pathogènes [109,115,116].

1. Découverte d'une autophagie antivirale localisée à la membrane plasmique ?

L'hypothèse d'un flux localisé à la membrane plasmique émerge partiellement des travaux menés par le Docteur Rubinsztein *et coll.* qui montrent que la membrane plasmique contribue à la formation de structures pré-autophagiques [329,334,338] (**illustration 27B**). Des vésicules pré-endosomales générées par une endocytose clathrine médiée deviennent des plateformes d'assemblage pour d'autres composants autophagiques impliqués dans la biogénèse autophagosomale [441]. Les protéines Atg16L et Atg9 semblent toutes deux associées à des vésicules à clathrine et contribuent à l'apport de membranes lipidiques provenant de la membrane plasmique pour la biogénèse de l'autophagosome via des voies différentes [330,337]. La protéine **Atg9** a été montré chez la levure comme étant liée au réseau de protéines SNARES [442], la protéine mammifère Atg9 traverse une voie conventionnelle endosomale allant des endosomes précoces aux endosomes de recyclage où les vésicules $Atg9^+$ vont pouvoir fusionner avec les vésicules $Atg16L^+$ dans un processus régulé par des protéines SNARE impliquées dans les processus de fusions vésiculaires [338,441]. De façon très intéressante, il est également connu que l'engagement du récepteur DC-SIGN par le VIH-1 induit une endocytose clathrine dépendante (**fig. 6**) [138,139]. Étant donné que la protéine Atg9 transite dans les endosomes précoces puis vers les endosomes de recyclage nous nous sommes donc demandé si cette protéine pouvait être impliquée dans le trafic intracellulaire du récepteur.

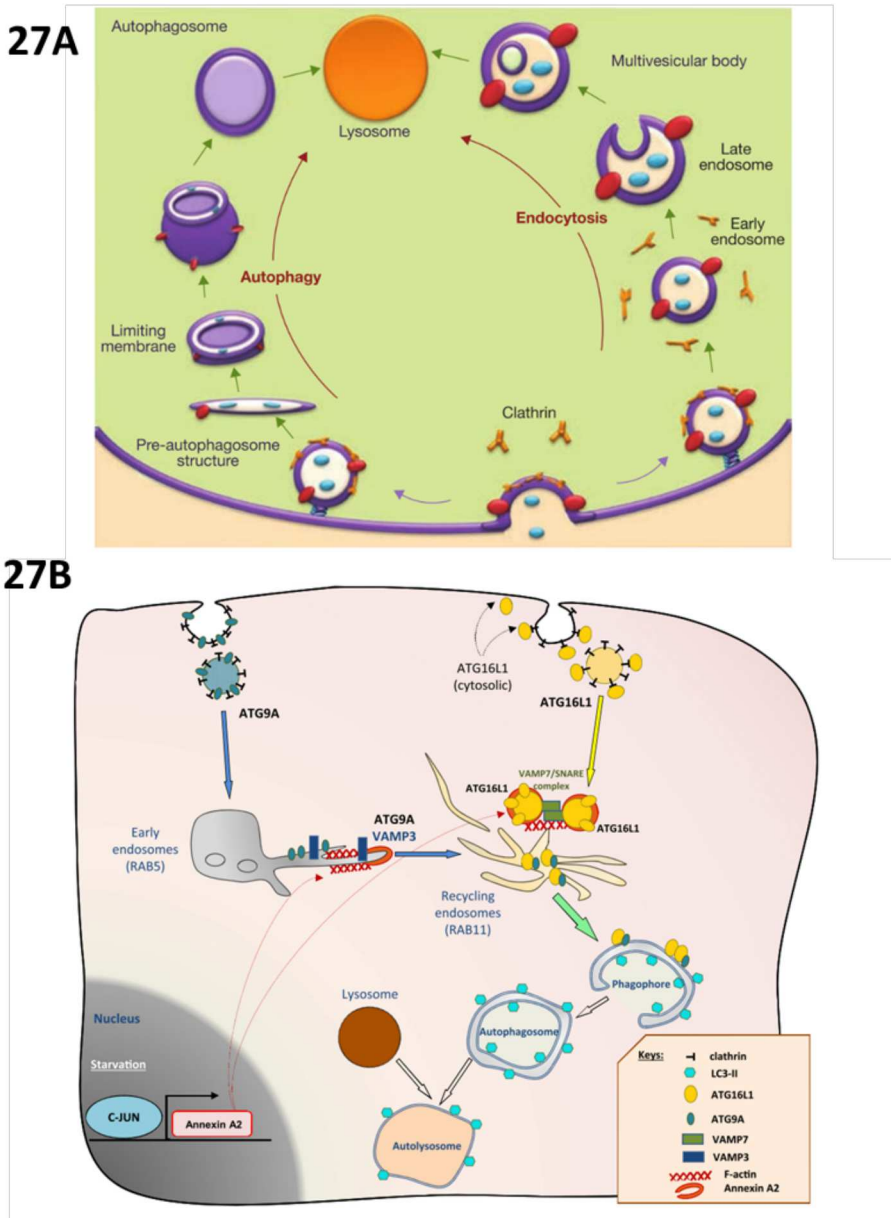


Illustration 27 – Hypothèse d'un flux autophagique localisé à la membrane plasmique

•Le complexe ULK1 (**ULK1, Atg13**, Atg101, FIP200), qui est recruté au site de formation du phagophore est requis pour à son tour recruter le complexe PI3KC3 générant du PI3P nécessaire pour l'initiation de la macro-autophagie (chapitre D.9.1.1). Il est globalement accepté que la macro-autophagie se forme au niveau de la région péri-nucléaire, au niveau du RE (omégasome). Ce dernier jouerait un rôle essentiel pour l'apport de membranes lors de l'initiation de l'autophagie notamment en condition basale (recyclage d'organites) ou de carence nutritive [331]. Néanmoins, les autophagosomes sont composés de membranes provenant de différentes organelles, notamment celles liées aux trafic endosomal mais aussi de la membrane plasmique [330,334]. La biogénèse des autophagosomes et la source de membranes constituant les organelles autophagiques sont des thématiques de recherche très débattues dans la communauté scientifique [443] (**illustration 27B**). L'autophagie résultant d'un

stress ou stimuli exogènes liés par exemple à l'entrée de pathogènes a été décrite dans de nombreux contextes infectieux [444]. En revanche, il existe très peu d'études décrivant l'autophagie comme pouvant être générée par un stress exogène localement à la membrane plasmique lors de la reconnaissance de pathogènes par un PRR ou un récepteur de surface. Par exemple, le récepteur CD46 (qui n'est pas considéré comme un PRR) reconnaissant le virus de la rougeole permet l'induction de l'autophagie [414].

Suivant l'hypothèse des modèles proposés par le Docteur Cuervo (**illustration 27A**) [445] et les Docteurs Pavel et Rubinsztein [336,446] (**illustration 27B**) la membrane plasmique pourrait contribuer à la formation du phagophore. Afin de savoir si l'induction autophagique que nous décrivons après engagement de DC-SIGN **(fig. 2**) peut induire le recrutement de protéines liées à l'initiation de l'autophagie, nous avons entrepris des expériences d'immuno-marquage (microscopie) du récepteur DC-SIGN en cours d'endocytose et des protéines ULK1 et Atg13. Aux temps testés (15-30 minutes), nous n'avons pas observé de co-localisation entre ces protéines initiatrices de l'autophagie et le récepteur en cours d'internalisation **(fig. 3A**). On ne peut toutefois pas totalement exclure que ces protéines puissent être associés avec le récepteur à des temps plus courts au vu de leur rôle primordial dans l'initiation du flux autophagique. Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier si des protéines se liants aux PI3P comme les protéines WIPI (notamment WIPI2) ou DFCP1 pourraient être recrutées à la membrane plasmique et participer à l'élaboration d'une autophagie localisée. En effet, ces protéines sont impliquées dans le recrutement des partenaires autophagiques vers le phagophore en formation [314,321,447]. Le PI3P est un lipide signal crucial permettant le recrutement des protéines autophagique de liaison mentionné ci-dessus permettant de débuter l'élongation du phagophore [320] (chapitre D.9.1.3, illustration 19).

2. L'endocytose est nécessaire pour le recrutement de la protéine Atg9 lors de l'internalisation du récepteur DC-SIGN

Nous constatons que, comparé au récepteur DC-SIGN WT, le récepteur muté sur le motif dileucine (LL/AA) ainsi que celui muté sur le résidu lysine en position 5 (K5/A) (**fig. 9A**), présentant tout deux un défaut d'endocytose (**fig. 9B et C**), ne s'associent pas à la protéine Atg9 même après engagement ou internalisation du récepteur 30 minutes à 4 ou 37°C d'incubation avec des AC (**fig. 9B**). Cela suggère que les capacités endocytiques du récepteur doivent être fonctionnelles pour le recrutement d'Atg9 dans les vésicules formées lors de l'endocytose du récepteur DC-SIGN (**fig. 9**) et potentiellement lors de l'initiation de la voie autophagique dépendante du récepteur DC-SIGN (**fig. 2**). Afin de confirmer si l'endocytose du récepteur DC-SIGN est bien requise pour l'induction du flux autophagique dans un contexte infectieux, il sera intéressant de comparer l'induction de ce flux entre des cellules sur-exprimant le récepteur sauvage ou muté sur le motif LL/AA ou le résidu K5/A après engagement du récepteur DC-SIGN par le VIH-1.

•**Modulation du trafic vésiculaire (siRNA ou stress par drogue ou carence nutritive)**:
En dépit de ses rôles importants dans l'autophagie, Atg9 ne prend pas place dans les vésicules autophagiques, cette protéine réside dans des vésicules qui lui sont propres et son trafic très dynamique semble être régi par une signalisation cellulaire indépendante de celle du phagophore [329,330] (**illustration 27B**). Aussi, il a été décrit dans la littérature que la déplétion (siRNA) de ULK1 et Atg13 inhibe le trafic d'Atg9 qui reste alors localisé dans des régions juxta-nucléaire, bien que le recrutement d'Atg9 à l'omégosome ait été décrit comme indépendant de ULK1 ou d'une carence nutritive [328]. Selon nos données, DC-SIGN ne semble pas co-localiser avec ULK1 et Atg13 dans nos conditions expérimentales et aux temps effectués (**fig. 3A**). Toutefois, il serait intéressant de procéder à la déplétion de ces deux protéines liées à l'initiation de l'autophagie. En effet, dans l'hypothèse où cette déplétion bloquerait le **trafic d'Atg9** nous pourrions en apprendre davantage sur le rôle de cette protéine dans ce contexte ou l'autophagie joue un rôle anti-infectieux. Aussi, la carence nutritive en acides aminés ou le traitement à la rapamycine (qui induit l'autophagie) provoque une redistribution du pool d'Atg9 situé au niveau du RE et TGN vers la périphérie, notamment vers des membranes endosomales précurseurs de vésicules $LC3^+$ (LC3-GFP sur-exprimée) [328]. Il serait ainsi intéressant de se placer dans ces conditions lors de l'entrée du VIH-1 dans les DC afin d'observer si l'on observe une augmentation d'association DC-SIGN/Atg9 du fait de la meilleure disponibilité en périphérie de la Atg9, confirmant ainsi le rôle d'Atg9 dans l'initiation de la virophagie DC-SIGN dépendante. Enfin, il a été aussi rapporté qu'un traitement à la rapamycine dans des cellules myéloides (DC et macrophages) limite l'input viral et réduit significativement la transmission d'infection VIH-1 vers des lymphocytes T $CD4^+$ [79,158,430] (Campbell et Spector 2011 ; Blanchet 2010 ; Chauhan 2016). Des expériences de transfert viral (*trans*-infection) sont prévues à court terme afin de mieux définir le rôle de la protéine Atg9 au cours de la virophagie DC-SIGN dépendante dans les DC.

•**Trafic vésiculaire** : Nous montrons par ailleurs, que lors de l'engagement et l'internalisation du récepteur DC-SIGN par du ManLAM des vésicules Atg9/EEA-1 (marqueur des endosomes précoces) sont formées et l'endocytose du récepteur ne semble pas influer sur le niveau de co-localisation entre ces deux protéines (**fig. 6, partie gauche**). En revanche, ces protéines associées forment des vésicules circulaires qui semblent se déplacer d'une zone proche de la membrane plasmique à l'état basal vers une région péri-nucléaire après internalisation du récepteur à 37°C (**fig. 6A, partie gauche**). Afin de s'assurer que ces vésicules soient bien celles contenant le récepteur DC-SIGN un triple marquage DC-SIGN/EEA-1/Atg9 sera nécessaire. Des inihibiteurs de l'endocytose clathrine et calcium dépendante, tel que le dynasor (inhibiteur de la dynamine) ou l'EDTA (chélateur des ions calcium) pourrons aussi être utiliser afin de comparer l'effet de l'internalisation du récepteur sur la distribution de ces vésicules. Par ailleurs, nous observons, en accord avec d'autres publications [138,139] que l'endocytose générée par les AC est une voie d'endocytose clathrine-dépendante (**fig. 6A, partie droite**). Ainsi, il

serait intéressant d'étudier la possible implication de certaines protéines Rab et SNARE lors de la mise en place de cette autophagie localisée. En effet, les protéines Rab et SNARE sont particulièrement impliqués dans le trafic cellulaire notamment comme régulateurs du transport de vésicules tels que celui des endosomes précoces ou tardifs vers leurs lieux de dégradation (**chapitre B.5.5**). En effet, la protéine de fusion vésiculaire VAMP3 a été montrée comme régulant le trafic d'Atg9 vers des vésicules Atg16L^{+} afin d'agir telle une plateforme de recrutement pour d'autres protéines autophagiques importantes pour la biogénèse du phagophore (**illustration 27B**). Il serait donc intéressant d'étudier l'implication de certaine protéines SNARE afin de savoir si Atg9 pourrait être un des intermédiaires responsables de la fusion des vésicules endosomales formées lors de l'internalisation du récepteur DC-SIGN et la voie autophagique.

•**Signalisation** : Les **modifications post-traductionnelles d'Atg9** semblent jouer un rôle important pour la régulation de l'autophagie chez la levure. En effet , chez la levure, la mutation du résidu sérine S122 de la protéine Atg9 inhibe la phosphorilation de la protéine Atg9 ce qui est important pour son interaction avec Atg27 et Atg23. Cette inhibition d'intéraction protéique induit alors une diminution de l'activité autophagique chez des levures mutées sur le résidu sérine S122 de la protéine Atg9 [448]. C'est la kinase Atg1 (orthologue de ULK1 chez les mammifères) qui régule la protéine Atg9 en la phosphorylant directement et lui permettant d'interagir avec ses partenaire Atg23 et Atg27 (Atg27 et 23 ne possèdent à l'heure actuelle aucun orthologue humain connu). Ainsi, générer un mutant similaire de la protéine Atg9 humaine pour étudier le rôle d'Atg9 dans notre modèle d'étude et le contexte infectieux pourrait s'avérer être intéressant afin de connaître l'implication de certaines modifications post-traductionnelle dans la signalisation induite par Atg9 lors de l'endocytose du récepteur DC-SIGN.

4. LA PROTEINE TRIM25 S'ASSOCIE AU RECEPTEUR DC-SIGN DURANT SON ENDOCYTOSE

Afin d'éviter le biais lié à l'utilisation de cellules primaires de donneurs (DC), nous avons choisis d'effectuer l'analyse du protéome du récepteur DC-SIGN dans des lignées cellulaires monocytiques les THP-1 tranduites ou non pour exprimer stablement le récepteur DC-SIGN (**fig. 7A**). Les THP-1 parentales (non transduite) constituent un excellent contrôle négatif de bruit de fond « technique » lié à l'immuno-précipitation et au traitement des échantillons par phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (**fig. 7A**). En effet, ces cellules nous ont donc permis d'éliminer toutes protéines aspécifique à la présence ou à l'engagement du récepteur DC-SIGN. Un triplicat expérimental nous a permis de montrer que la **protéine TRIM25** est significativement associée au récepteur DC-SIGN et enrichie à 37°C (**fig. 7C, 8A,**). La protéine TRIM25 est une E3 ubiquitine ligase impliquée dans

la réponse immunitaire innée (Versteeg et al., 2013) et sa principale cible identifiée est le récepteur RIG-I, dont l'ubiquitination conduit à la production d'interféron de type I [75]. Nous avons ensuite validé l'association endogène entre le récepteur DC-SIGN et la protéine TRIM25 par immunoprécipitation du récepteur DC-SIGN dans les cellules dendritiques (**fig. 8A, B**).

1. La protéine TRIM25 induit-elle la dégradation du VIH-1 par autophagie de précision ?

Actuellement, l'autophagie de précision est définie comme étant un mécanisme de dégradation sélectif mettant en jeu une protéine de la famille TRIM servant, d'une part, de récepteur de reconnaissance du substrat à dégrader spécifiquement et, d'autre part, servant de plateforme de recrutement de protéines autophagique comme les protéines ULK1, Beclin-1, Atg16L mais aussi certaines protéines de la famille Atg8, formant ainsi un TRIMosome [426,449]. La dégradation autophagique induite par ce TRIMosome, cette forme hautement spécifique d'autophagie, a été définie comme étant l'autophagie de précision [254].

Lors de l'étude de l'internalisation du récepteur DC-SIGN par microscopie (**fig. 3A et B**) dans les DC, nous n'observons pas d'intéraction entre le récepteur DC-SIGN et les protéines autophagiques ULK1 et Atg16L impliquées dans le TRIMosome et la dégradation par autophagie de précision. Il serait cependant intéressant de réaliser des études d'immunoprécipitation de la protéine TRIM25 afin d'étudier son l'association biochimique avec ULK1, Atg16L ou encore Beclin-1 en condition de surexpression et/ou d'engagement du récepteur DC-SIGN. Cela nous permettra alors de savoir si le phagophore peut se former autour de la protéine TRIM25, telle une plateforme de recrutement, comme dans le cadre de la formation d'un TRIMosome, lors d'une éventuelle dégradation par autophagie de précision.

Par ailleurs, une autre propriété décrite du TRIMosome est la capacité de la protéine TRIM à interagir avec des membres de la famille Atg8 afin de recruter les organelles autophagiques. Nous observons que la protéine TRIM25 endogène (HEK293T) semble interagir avec certaines isoformes de la protéine LC3 (notamment A et B) (**fig. 10C**), nous observons aussi que l'engagement et l'internalisation du récepteur DC-SIGN semble induire un enrichissement de l'isoforme LC3-C associé à TRIM25. Il sera intéressant de recommencer cette expérience avec cette fois TRIM25 comme appât (IP TRIM25) afin de valider si la protéine LC3-C pourrait être impliquée dans le ciblage du VIH-1 vers la dégradation autophagique dépendante du récepteur DC-SIGN. Ces expériences seront a réaliser en présence de toutes les isoformes de la famille Atg8 notamment les formes GABARAP qui ont été montrées comme interagissant préférentiellement (LC3-A aussi) avec les protéines de la famille TRIM [432].

Certaines protéines de la famille TRIM peuvent ne pas exprimer de domaine LIR (domaine d'interaction avec les protéines Atg8) ou en exprimer un ou plusieurs, constituant le cas échéant une piste favorable pour étudier le rôle de la TRIM d'intérêt en tant que plateforme TRIMosome [249,450]. En utilisant l'algorithme « LIR consensus » qui permet d'aligner la séquence d'une protéine d'intérêt avec 26 LIR domaines putatifs [451] il semble que TRIM25 en soit dépourvu. Cependant, la présence d'un tel motif n'est pas absolument requis pour interagir avec une protéine de la famille Atg8 et jouer un rôle dans la dégradation autophagique. En effet, cette interaction peut être indirecte, c'est le cas de plusieurs protéines de la famille TRIM comme par exemple de la protéine TRIM5α [249,452] ou encore de la protéine TRIM55 qui ne semble pas se lier à ULK1 and Beclin-1 mais affecte fortement l'autophagie. Les différentes interactions protéines 'TRIM - protéines autophagiques' ont été discutées dans le chapitre d'introduction **D.10.4, tableau 9**. De plus, dans les conditions expérimentales mises au point lors du screening réalisé dans l'étude de Mandell *et al*, visiblement, Trim25 ne se dégage pas comme un potentiel candidat pour la formation d'un TRIMosome impliqué dans l'autophagie de précision [426]. Enfin, comme discuté précédemment, une étude récente décrit que le VIH-1 ou du moins certain composants viraux (capside) peuvent être dégradés dans un complexe impliquant une protéine de la famille TRIM sans pour autant impliquer les protéines identifiées dans le mécanisme d'autophagie de précision [131,244]. Cela pourrait être pourrait être le cas du complexe DC-SIGN-TRIM25-Atg9-LC3 décrit lors de ma thèse (**fig. 10A, B, C, 11**).

Enfin, un récepteur autophagique est définit actuellement comme étant une protéine s'associant d'une part à une protéine de la famille Atg8 et d'autre part à un substrat spécifique afin de permettre la dégradation de ce dernier par autophagique tout en étant aussi dégradé [355]. L'autophagie de précision repose sur la formation d'un TRIMosome (complexe autour d'une protéine de la famille TRIM), après reconnaissance de son substrat la TRIM va permettre assemblage du phagophore autour de cette TRIM via le recrutement de protéines liées à l'initiation autophagique (ULK1 et Beclin-1). La TRIM agit alors comme une plateforme de recrutement protéique dans le but de dégrader spécifiquement une protéine cible. Comme lors de l'autophagie sélective et de précision, le récepteur ou ici la plateforme TRIM est dégradée en même temps que le substrat ciblé. Si la dégradation du VIH-1 par autophagie implique TRIM25 en tant que plateforme d'autophagie de précision alors TRIM25 en tant que récepteur et plateforme autophagique devrait être dégradée au cours du temps, cela devra prochainement être évalué en western blot dans les DC en présence ou non de drogues bloquant la dégradation lysosomale/autophagique.

2. La protéine TRIM25 via son activité E3 ligase régule t'elle spécifiquement la signalisation du récepteur DC-SIGN ? Vers la virophagie ?

Nous montrons, d'une part, que TRIM25 interagit avec DC-SIGN via son domaine RING (**fig. 8D**) lui conférant son activité E3 ubiquitine ligase [75]. D'autre part, les mutations simples (nous n'avons pas encore synthétisé le double mutant) réalisées indépendemment sur les deux seuls résidus lysines contenus dans le domaine cytoplasmique du récepteur DC-SIGN montrent un profil d'endocytose très intéressant. En effet, si l'on compare ces deux nouveaux mutants synthétisés lors de mes travaux de thèse avec le récepteur DC-SIGN WT ou celui muté sur le motif dileucine LL/AA défectif pour l'endocytose [118,119], la mutation sur la lysine en position 5 semble affecter les capacités endocytiques (**fig. 9B, C**) du récepteur et sa capacité à s'associer à la protéine Atg9 (**fig. 9**). La mutation en position 32 semble seulement légèrement affecter la capacité d'endocytose du récepteur (**fig. 9B, C**) et semble induire une diminution de son association avec la protéine Atg9 (**fig. 9**). Ensemble, ces données tendent à montrer que le récepteur DC-SIGN pourrait subir des modifications post-traductionnelles (comme l'ubiquitination) importantes pour réguler l'endocytose et le sorting du récepteur (**fig. 9**) et aussi pour la signalisation vers la dégradation autophagique (**fig. 8E**). En collaboration avec l'équipe dirigée par le docteur Caroline Goujon (IRIM, Montpellier), nous avons généré des constructions lentivirales des récepteurs DC-SIGN WT ou mutés sur les lysines (K5/A et K32/A). Ces constructions nous permettrons de pouvoir créer des lignées cellulaires (THP-1 et HEK293T) exprimant stablement (par tranduction) ces récepteurs de façon à pouvoir plus aisément étudier : l'impact de ces mutations sur l'endocytose du récepteur, comparer le profil d'ubiquitination des récepteurs après immunoprécipitation, de déterminer si le récepteur DC-SIGN est directement ubiquitinylé et déterminer le rôle de l'E3 ligase TRIM25 dans la signalisation du récepteur DC-SIGN. Enfin, cela nous permettra d'analyser l'impact des modifications post-traductionnelles induite directement sur le récepteur DC-SIGN et les conséquences sur la virophagie anti-VIH-1.

Etant donné que la protéine TRIM25 ne semble pas exprimer de LIR domaines (données non montrées) mais semble être reliée au récepteur DC-SIGN via son domaine E3 ligase, nous avons voulu savoir si le membre le plus représentatif de la famille des récepteurs autophagiques, **p62**, pouvait interagir avec le récepteur DC-SIGN dans l'hypothèse d'une autophagie sélective (**fig. 3A, B**). En effet, p62 est un récepteur autophagique (SLR) impliqué dans la liaison (domaine UBA) de substrats ubiquitinylés, permettant grâce à sa capacité de liaison avec les protéines de la famille Atg8 (domaine LIR), d'acheminer le substrat vers la dégradation autophagique [453]. Nous avons analysé si ce récepteur autophagique pouvait être associé avec le récepteur DC-SIGN lors de son internalisation afin d'acheminer sélectivement le substrat capturé par DC-SIGN vers la dégradation par autophagie sélective. Aux temps testés (15-30 minutes d'internalisation), nous ne constatons pas d'association du

récepteur DC-SIGN avec p62 (**fig. 3A, B**). Cependant, nous n'avons pas analysé en détail cette association ni celle d'autres récepteurs autophagiques par des investigations biochimiques. Par exemple, comme le SLR NDP52 reconnaît le récepteur lectine de type I, la galectine 8 et 3 [80,369], nous pourrions émettre l'hypothèse que DC-SIGN pourrait, en tant que lectine de type C être reconnu par le SLR NDP52 afin de promouvoir la virophagie sélective anti-VIH-1.

5. Le complexe DC-SIGN-TRIM25-Atg9-LC3

1. Le complexe croise-t-il les protéines du signalosome DC-SIGN ?

Il serait intéressant de relier nos travaux à ceux réalisés sur la signalisation du récepteur DC-SIGN intensément décrite par le groupe des docteurs Gringhuis et Geijtenbeeck [128,454]. En effet, a été décrit par ce groupe que la protéine LSP1 semble faire le lien entre le CLR langerine (CD207) et TRIM5α afin de recruter des protéines autophagiques générant la dégradation de la capside virale du VIH-1 [131]. Bien que cette dégradation autophagique regie sous le contrôle d'un complexe CD207-LSP1-TRIM5-Atg16L-Atg5 semble dépendant du type cellulaire, il serait intéressant d'analyser l'implication de la protéine LSP1 dans l'association DC-SIGN / TRIM25. Dans cette étude, les auteurs montrent que le récepteur langerine est associé à l'état basal à la protéine LSP1 ainsi qu'à l'E3 ligase TRIM5α et Atg16L. L'internalisation du récepteur langerine par le VIH-1, conduit à l'acheminement du virus dans les granules de Birbeck où TRIM5α va pouvoir reconnaître la capside virale (p24) et induire le recrutement d'Atg5 promouvant la lipidation de LC3-II et ainsi la formation d'autophagosome permettant la dégradation du VIH-1 [131]. TRIM5α (humain) apparaît donc dans ce sous-type de DC comme étant un facteur de restriction associé au récepteur langerine et promouvant la dégradation du VIH-1 par autophagie. Cependant, ce modèle est à discuter quant aux rôles des protéines associées dans le complexe formé dans ce sous-type de DC et leurs capacités de recrutement du phagophore. Les auteurs considèrent qu'Atg5 et Atg16L pourrait promouvoir la nucléation de la protéine LC3-II au phagophore liant ainsi le complexe décrit et la dégradation autophagique. En effet, dans la littérature Atg5 et Atg16L sont des protéines autophagiques qui ont été décrites comme intervenant plutôt dans l'élongation d'un phagophore formé au préalable [295,355]. L'autophagie de précision décrite par l'équipe du docteur Deretic en revanche décrit l'interaction des protéines TRIM avec des protéines de l'initiation autophagique et faisant ainsi un lien cohérent avec la capacité des protéines TRIM d'agir en tant que plateforme d'assemblage du phagophore [432].

Comme détaillé dans le chapitre de mon introduction de thèse B.5.4.4, la protéine LSP1 a été décrite comme étant associée au récepteur DC-SIGN de façon basale et joue un rôle important pour la formation du complexe de signalisation « DC-SIGN signalosome » composé des protéines LSP1-KSR1-CNK permettant de promouvoir les réponses anti-infectieuses [127]. La dégradation autophagique du

VIH-1 médiée par le récepteur langerine et TRIM5α humain semble spécifique de ce récepteur et des cellules utilisées (LC) puisque ce n'est pas le cas pour le récepteur DC-SIGN internalisé par le VIH-1 qui au contraire montre une dissociation DC-SIGN/TRIM5α [131]. Nous avons retrouvé la protéine LSP1 dans le protéome de du récepteur DC-SIGN de façon non significative (**fig. 7C**), il serait néanmoins intéressant dans le cadre de notre étude, de mieux définir le rôle de la protéine LSP1 lors de la virophagie DC-SIGN médiée. En effet, nos expériences de co-IP en condition de surexpression ne démontrent pas que les associations décrites sont directes entre les différents partenaires protéiques identifiés, ainsi, les protéines du 'DC-SIGN signalosome' pourraient peut-être être impliquées dans le routage du récepteur vers la dégradation autophagique (**fig. 8, 10**). Cela est d'autant plus intéressant lorsque l'on sait que la protéine LSP1 a été impliquée dans la dégradation du VIH-1 dans les DC par le protéasome [130].

2. Dégradation du VIH-1 par autophagie sélective dans les DC

Enfin, il est particulièrement important de vérifier l'hypothèse que les protéines Atg9 et TRIM25 puissent être impliquées dans la dégradation lysosomale autophagique-dépendante lors de l'entrée du VIH-1 via le récepteur DC-SIGN. Pour cela, nous sommes en train de mettre au point des expériences de déplétion de la protéine Atg9 et TRIM25 (DC et HEK293T) par siRNA. Nous observerons l'effet de la déplétion d'Atg9 sur l'endocytose du récepteur DC-SIGN (par cytométrie en flux), sur l'induction de l'autophagie (cinétique d'internalisation par western blot), sur le trafic du récepteur DC-SIGN (marquage immonofluorescent de DC-SIGN, LC3 et LAMP1 à des temps plus tardifs) et enfin sur le transfert de l'infection (DC silencées et infectées par le VIH-1 en co-culture avec des LT $CD4^+$, JLTR5). Sur une échelle de temps plus tardive, et si les résultats s'avèrent concluant, il sera alors intéressant d'évaluer l'impact de la déplétion d'Atg9 dans les DC infectées sur la présentation antigénique CMH-II-médiée vers des clones T $CD4^+$ spécifiques du VIH-1 comme décrit précédemment [92,158,159]. La déplétion de la protéine TRIM25 dans les DC et lignées cellulaires (HEK293T), apporteront de nombreuses réponses quant au rôle de cette protéine vis-à-vis de l'endocytose, la signalisation et l'adressage du VIH-1 vers la dégradation autophagique. Aussi dans l'hypothèse où les mutants de TRIM25 (**fig. 8B**) puissent se comporter comme forme dominante en condition de surexpression, il serait intéressant de déterminer l'impact de la mutation de motifs cruciaux composant la protéine TRIM25 (**fig. 8C**) sur la formation du complexe TRIM25-DC-SIGN-Atg9-LC3 et son implication dans la virophagie anti-VIH-1.

3. Une autophagie dépendante du récepteur DC-SIGN, applicable à d'autres CLR ? D'autres pathogènes que le VIH-1 ?

Par ailleurs, la protéine Atg9 pourrait aussi jouer un rôle dans l'adressage du récepteur DC-SIGN engagé par le VIH-1 mais aussi par d'autres pathogènes vers la dégradation autophagique. En effet, bien que l'effet induit soit plus important en présence de VIH-1, le ManLAM exprimé naturellement par les Mycobactéries semble aussi induire l'association entre DC-SIGN/Atg9 (**fig. 2, 5**), élargissant ainsi l'implication du mécanisme à d'autres pathogènes reconnus par le récepteur DC-SIGN dans les DC. Il pourrait être intéressant de réitérer ces expériences en présence d'autres pathogènes naturellement reconnus par le récepteur (tableau 4, chapitre B.5.4.3). Enfin, pour aller plus loin nous pouvons aussi nous demander si cette autophagie antivirale locale induite rapidement tel un mécanisme de défense innée pourrait aussi avoir lieu lors de l'engagement d'autres CLR [131] ou d'autres pathogènes. Ainsi, de nouvelles perspectives s'ouvrent alors afin d'explorer plus largement l'impact de récepteurs de l'immunité innée et la dégradation sélective.

CONCLUSION GENERALE

Pour conclure, les résultats que j'ai obtenu durant ma thèse montrent que le VIH-1 pourrait être dégradé dans les cellules dendritiques par autophagie sélective. La formation d'un complexe de type TRIMosome (DC-SIGN-TRIM25-Atg9-LC3) ou plus généralement un complexe impliqué dans un processus de type amphisome régulé, d'une part, par une protéine de la famille TRIM et, d'autre part, par la protéine autophagique Atg9. Puisque les rôles exacts de ces deux partenaires du récepteur DC-SIGN sont encore à déterminer, j'ai choisis l'illustrer les deux théories pouvant (co)-exister durant l'entrée du VIH-1 via le récepteur DC-SIGN dans les DC par un schéma (**illustration 28**) et un tableau récapitulatif des résultats décrits durant ma thèse, les questions que cela soulève ainsi que les suggestions expérimentales à mettre en œuvre afin de pouvoir y répondre (**tableau 12**).

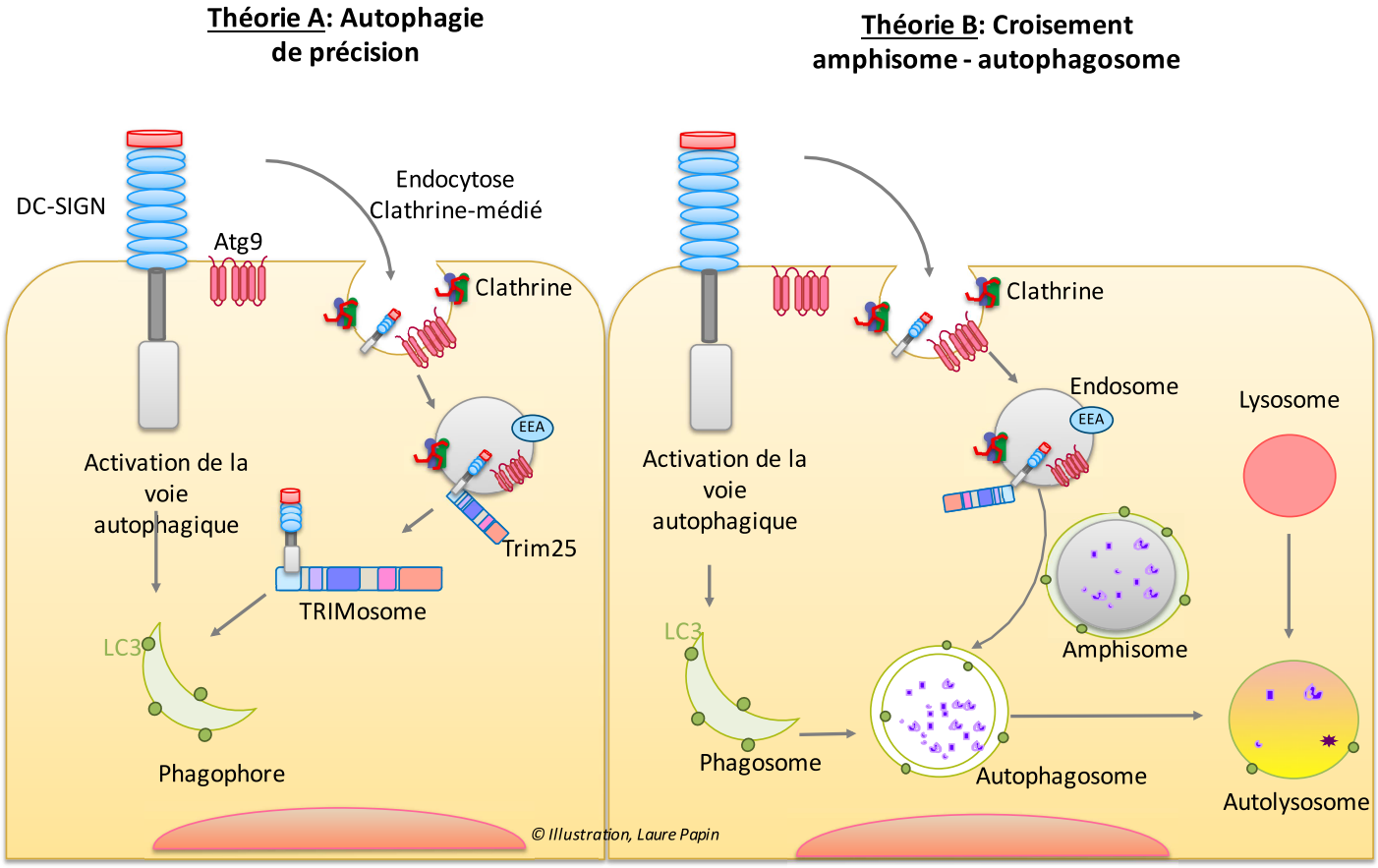


Illustration 28 - Théorie sur la virophagie sélective du VIH-1 dans les cellules dendritiques

Résultat mis en évidence lors de ma thèse	Questions que soulève mes résultats de thèse	Proposition expérimentales pour y répondre
L'engagement du récepteur DC-SIGN induit l'autophagie (augmentation au cours du temps de LC3-II), des vésicules DC-SIGN+/Atg9+ sont formées directement à la membrane plasmique	Cette autophagie est elle localisée, générée directement à la membrane plasmique ?	Réaliser un triple marquage IF Atg9/DC-SIGN/WIPI ou DFCP1
	L'autophagie anti-VIH DC-SIGN médié peut-elle être appliquée plus généralement à d'autres CLR ?	Comparer les mécanismes induit lors de l'entrée d'autres CLR exprimés par les DC et reconnaissant le VIH : MR, DCIR, Dectin-1 et -2
Atg9 intéragit avec DC-SIGN, TRIM25 et EEA	Quel est le rôle d'Atg9 dans ce mécanisme d'autophagie DC-SIGN médié ?	siRNA α Atg9 puis cinétique d'internalisation de DC-SIGN, conséquences sur : l'endocytose (par Facs), sur le trafic du récepteur ((IF triple marquage DC-SIGN/LC3/EEA dans les temps courts, DC-SIGN/LC3/LAMP-1 dans les temps plus tardifs) sur le transfert de virions (co-culture DC/LT CD4+), sur les réponses immunes (co-culture avec des clones LT CD4+ spécifiques du VIH)
TRIM25 est enrichi à 37°C lors de l'internalisation de DC-SIGN et interagit avec Atg9 et LC3-A et -B	Quel est le rôle de TRIM25 dans ce mécanisme d'autophagie DC-SIGN médié ?	siRNA α TRIM25 puis cinétique d'internalisation de DC-SIGN, conséquences sur : l'endocytose (par Facs), sur le trafic du récepteur (IF triple marquage DC-SIGN/LC3/EEA dans les temps courts, DC-SIGN/LC3/LAMP-1 dans les temps plus tardifs), sur le transfert de virions (co-culture DC/LT CD4+), sur les réponses immunes (co-culture avec des clones LT CD4+ spécifiques du VIH)
TRIM25 intéragit avec DC-SIGN via son domaine RING En comparaison avec DC-SIGN WT : le mutant DC-SIGN K5/A n'est pas capable d'être internalisé et n'intéragit pas avec Atg9. Le mutant DC-SIGN K32/A est internalisé et intéragit moins intensément avec Atg9.	DC-SIGN est-il ubiquitinylé ? Si oui quelle est l'E3 ligase responsable de cette modification post-traductionnelle ? Est ce TRIM25 ? La mutation K5/A a t'elle un impact sur l'endocytose ou sur la signalisation du récepteur DC-SIGN ?	Pour définir le rôle de TRIM25 dans l'ubiquitination de DC-SIGN (co-IP TRIM25 WT versus mutants ΔRING + DC-SIGN), comparer le profil d'ubiquitination des récepteurs WT versus mutants sur les lysines (K/A et K32/A) après IP en l'absence ou non de TRIM25 (siRNA). Synthétiser un double mutant K5/A_K32/A (mutagénèse dirigée) et comparer son phénotype aux récepteurs sauvage et mutants.
Un complexe DC-SIGN-TRIM25-Atg9-LC3 est formé	Quel est le mécansime autophagique précis généré par l'internalisation de DC-SIGN ?	siRNA α Atg9 ou TRIM25 ou protéine crutiale pour l'autophagie (par exemple Atg5, 7) puis cinétique d'internalisation de DC-SIGN, conséquences sur : l'endocytose (par Facs), sur le trafic du récepteur ((IF triple marquage DC-SIGN/LC3/EEA dans les temps courts, DC-SIGN/LC3/LAMP-1 dans les temps plus tardifs) sur le transfert de virions (co-culture DC/LT CD4+), sur les réponses immunes (co-culture avec des clones LT CD4+ spécifiques du VIH)
Le ManLAM semble induire le flux autophagique et Atg9 et TRIM25 sont recrutées lors de l'engagement de DC-SIGN par ce composé	L'autophagie anti-VIH DC-SIGN dépendante peut-elle être appliquée plus généralement à d'autres pathogènes ?	Comparer les mécanismes induit lors de l'entrée d'autres pathogènes naturellement reconnus par le récepteur C-SIGN

Tableau 12 - Questions soulevées par les résultats de thèse

Comme décrit dans la littérature, le VIH-1 est reconnu en partie par le récepteur DC-SIGN [105] entrainant l'entrée du virus dans une vésicule endocytose à clathrine [138,139] (**fig. 6, illustration 28**). Nous montrons que dès 30 minutes d'endocytose de DC-SIGN l'autophagie (augmentation de LC3-II) est induite (**fig. 2**). Nos résultats montrent que l'endocytose du récepteur génère d'une part, le recrutement de la protéine TRIM25 (**fig. 7C et 8**) et d'autre part le recrutement de la protéine Atg9 (**fig. 3, 4, 5**) directement à la membrane plasmique. Il reste encore à déterminer précisément le rôle de ces deux protéines Atg9 et TRIM25 (siRNA en cours de mise au point) lors de l'entrée du VIH-1 dans les DC (**tableau 12**). Nous montrons que la protéine TRIM25 se lie au récepteur DC-SIGN via son domaine RING (**fig. 8D**), la protéine TRIM25 pourrait alors jouer son rôle d'E3 ligase en ubiquitinant le récepteur DC-SIGN (peut-être sur les lysines en position 5 et 32 ou les deux) (**fig. 9).** Les modifications post-traductionnelles induite sur le récepteur pourraient alors participer à l'induction d'autophagie constatée lors de l'endocytose du récepteur (**fig. 2**). Dans une théorie plaçant TRIM25 au cœur d'un complexe de type TRIMosome (**illustration 28A**) TRIM25 pourrait alors lier d'une part à la protéine Atg9, au récepteur DC-SIGN (domaine RING) (**fig. 8D**) et d'autre part à certaines certaines protéine la famille Atg8 (à déterminer si un isotype est préférentiellement impliqué) (**fig. 8C**). Quant à Atg9, nous montrons que cette protéine est recrutée directement à la membrane plasmique dès l'engagement du récepteur à 4°C et suivant ensuite le récepteur durant son endocytose (**fig.3, 4, 5**). La protéine Atg9 pourrait alors favoriser le transport de l'endosome formé (**illustration 28B**) ou du complexe type TRIMosome (**illustration 28A**) lors de l'entrée DC-SIGN dépendante du fait de son rôle déjà décrit de transporteur de membrane vers le phagophore/autophagosome et sa capacité de liaison à certaine protéine SNARES liées à la fusion et l'attachement inter-vésiculaire. Dans cette théorie, la formation complexe de type TRIMosome (DC-SIGN-TRIM25-Atg9-LC3) (**illustration 28**) constituerai un signal suffisant pour que le phagosome puisse venir s'assembler autour du complexe et ainsi permettre la dégradation par autophagie du VIH-1 durant les premières heures de son entrée dans les DC. Cette théorie du TRIMosome, pourrait expliquer l'interaction entre TRIM25 et Atg9 en condition basale de surexpression dans les HEK293T en l'absence du récepteur DC-SIGN (**fig. 8A, B**). La théorie de l'amphisome (**illustration C2**) Atg9 et DC-SIGN partageraient la même vésicule d'endocytose clathrine médié et DC-SIGN suivrait alors le trafic de cette protéine afin d'être guidé avec le VIH-1 vers la dégradation autophagique (**fig. 5**). La protéine Atg9 a été décrite comme pouvant potentiellement avoir un rôle de plateforme pour d'autres protéines Atg [336], il se pourrait alors qu'Atg9 serve de lien entre la voie endosomal générée par l'endocytose de DC-SIGN et la voie autophagique facilitant ainsi la fusion endosome/autophagosome (**illustration 27**).

La protéine **LC3** fait aussi partie de ce complexe formé lors de l'engagement et endocytose du récepteur DC-SIGN (**fig. 8C**). Mon équipe avait précédemment rapporté des évènements de colocalisation entre DC-SIGN et LC3 lors de l'internalisation par le VIH-1 [158] (**illustration 25**). Un des

rôles de la protéine LC3-II (lipidée) dans la macro-autophagie est de fermer les autophagosomes en cours de formation et lors de l'induction d'une autophagie sélective médiée par des récepteurs autophagiques tels que les SLR peuvent interagir avec plusieurs membres de la famille LC3 (Atg8) permettant ainsi l'acheminement du cargo vers la dégradation. Dans l'hypothèse de formation d'un amphisome (**illustration 28B**), la présence de protéine LC3 et de son rôle dans la fermeture de l'autophagosome renforce l'idée d'une autophagie locale initiée rapidement à la membrane plasmique telle un mécanisme de défense innée antimicrobien. Des investigations pourraient être réalisées lorsque le flux autophagique est induit par des drogues agissants sur l'initiation autophagique comme par exemple la rapamycine ou de la torin-1 afin d'observer les conséquences générées sur la dégradation sélective du VIH-1 par la voie DC-SIGN dépendante. Des études ont d'ailleurs déjà montré que l'induction de la voie autophagique avait un impact anti-VIH-1 significatif [158,388,455].

Ainsi, les nouvelles découvertes décrites durant mon projet de thèse ont permis d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes cellulaires mis en place après la détection du VIH-1 par un CLR et plus généralement de pathogènes dans les cellules dendritiques. D'autres investigations seront nécessaires afin de relier ces résultats obtenus aux données publiées précédemment par mon équipe comme discuté ci-dessus et surtout afin de progresser dans la compréhension spatio-temporelle de la dégradation du VIH-1 dans les cellules dendritiques. Mieux comprendre les événements précoces de l'infection des DC par le VIH-1 ainsi que l'induction de la réponse antivirale initiée par la voie autophagique pourra offrir un nouveau champ d'action pour les traitements antiviraux, particulièrement sur l'entrée virale qui représente un « point faible » du virus. L'étude de l'entrée et de la dégradation du VIH-1 dans les différents sous-types de DC primaires est un domaine de recherche pertinent afin de mieux comprendre la dissémination virale durant les étapes précoces de l'infection. La compréhension de ces mécanismes de dégradation impliquant notamment l'autophagie devrait finalement fournir de nouvelles cibles thérapeutiques pour limiter sélectivement la transmission virale tout en préservant et en favorisant la réponse immunitaire innée. En effet, notamment dans le cadre du projet international HIV-cure, de nombreuses stratégies vaccinales anti-VIH-1 impliquant les DC sont en cours d'études. Les recherches actuelles sur le VIH-1/SIDA s'inscrivent plus généralement, vers l'objectif 90-90-90, c'est à dire 90% des personnes vivant avec le VIH-1 qui connaissent leur statut sérologique vis-à-vis du VIH-1, 90% de ces personnes ayant accès au traitement et 90% des personnes sous traitement avec une charge virale indétectable. C'est grâce aux avancées multidisciplinaires de la recherche fondamentale, de la recherche clinique ainsi que les progrès concrets qu'il est possible aujourd'hui d'améliorer la vie des patients séropositifs, leur accès aux soins ou encore sur les sciences sociales qui nous permettent d'ouvrir les yeux sur la réalité du Sida et les conséquences qu'engendre l'infection par le VIH-1 chez les personnes séropositives.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Barré-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220,** 868–71 (1983).
2. Sharp, P. M. & Hahn, B. H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **1,** a006841 (2011).
3. Peeters, M., D'Arc, M. & Delaporte, E. Origin and diversity of human retroviruses. *AIDS Rev.* **16,** 23–34 (2014).
4. Faria, N. R. *et al.* HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science* **346,** 56–61 (2014).
5. Peeters, M. & Delaporte, E. [Genetic diversity of HIV infection worldwide and its consequences]. *Med. Trop. (Mars).* **59,** 449–55 (1999).
6. Rambaut, A., Posada, D., Crandall, K. A. & Holmes, E. C. The causes and consequences of HIV evolution. *Nat. Rev. Genet.* **5,** 52–61 (2004).
7. Cooper, A. *et al.* HIV-1 causes CD4 cell death through DNA-dependent protein kinase during viral integration. *Nature* **498,** 376–379 (2013).
8. Doitsh, G. & Greene, W. C. Dissecting How CD4 T Cells Are Lost during HIV Infection. *Cell Host Microbe* **19,** 280–291 (2016).
9. Doitsh, G. *et al.* Abortive HIV Infection Mediates CD4 T Cell Depletion and Inflammation in Human Lymphoid Tissue. *Cell* **143,** 789–801 (2010).
10. Doitsh, G. *et al.* Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature* **505,** 509–14 (2014).
11. Galloway, N. L. K. *et al.* Cell-to-Cell Transmission of HIV-1 Is Required to Trigger Pyroptotic Death of Lymphoid-Tissue-Derived CD4 T Cells. *Cell Rep.* **12,** 1555–1563 (2015).
12. Espert, L. *et al.* Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J. Clin. Invest.* **116,** 2161–2172 (2006).
13. Ganser, B. K., Li, S., Klishko, V. Y., Finch, J. T. & Sundquist, W. I. Assembly and analysis of conical models for the HIV-1 core. *Science (80-.).* **283,** 80–83 (1999).
14. Clerc, I. *et al.* Polarized expression of the membrane ASP protein derived from HIV-1 antisense transcription in T cells. *Retrovirology* **8,** 74 (2011).
15. Cassan, E., Arigon-Chifolleau, A.-M., Mesnard, J.-M., Gross, A. & Gascuel, O. Concomitant emergence of the antisense protein gene of HIV-1 and of the pandemic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113,** 11537–11542 (2016).
16. Dragic, T. *et al.* HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381,** 667–673 (1996).
17. Dalgleish, A. G. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 763–767 (1984).
18. Fiser, A.-L. *et al.* Pairwise Comparison of Isogenic HIV-1 Viruses: R5 Phenotype Replicates More Efficiently Than X4 Phenotype in Primary CD4+ T Cells Expressing Physiological Levels of CXCR4. *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **53,** 162–166 (2010).
19. Janas, A. M., Dong, C., Wang, J.-H. & Wu, L. Productive infection of human immunodeficiency virus type 1 in dendritic cells requires fusion-mediated viral entry. *Virology* **375,** 442–451 (2008).
20. Burleigh, L. *et al.* Infection of Dendritic Cells (DCs), Not DC-SIGN-Mediated Internalization of Human Immunodeficiency Virus, Is Required for Long-Term Transfer of Virus to T Cells. *J. Virol.* **80,** 2949–2957 (2006).
21. Sattentau, Q. J. Cell-to-cell spread of retroviruses. *Viruses* **2,** 1306–1321 (2010).
22. Corbeil, J. & Richman, D. D. Productive infection and subsequent interaction of CD4-gp120 at the cellular membrane is required for HIV-induced apoptosis of CD4+ T cells. *J. Gen. Virol.* **76,** 681–690 (1995).
23. Chojnacki, J. *et al.* Maturation-Dependent HIV-1 Surface Protein Redistribution Revealed by Fluorescence Nanoscopy. *Science (80-.).* **338,** (2012).
24. Campbell, E. M. & Hope, T. J. HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nat. Rev. Microbiol.* **13,** 471–483 (2015).
25. Abram, M. E., Ferris, A. L., Shao, W., Alvord, W. G. & Hughes, S. H. Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication. *J. Virol.* **84,** 9864–78 (2010).
26. Forshey, B. M., von Schwedler, U., Sundquist, W. I. & Aiken, C. Formation of a human immunodeficiency virus type 1 core of optimal stability is crucial for viral replication. *J. Virol.* **76,** 5667–77 (2002).
27. Matreyek, K. & Engelman, A. Viral and Cellular Requirements for the Nuclear Entry of Retroviral Preintegration Nucleoprotein Complexes. *Viruses* **5,** 2483–2511 (2013).
28. Popov, S., Rexach, M., Ratner, L., Blobel, G. & Bukrinsky, M. Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex. *J. Biol. Chem.* **273,** 13347–52 (1998).

29. Arhel, N. Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology* **7,** 96 (2010).
30. Schröder, A. R. W. *et al.* HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110,** 521–9 (2002).
31. Friedrich, B., Li, G., Dziuba, N. & Ferguson, M. R. Quantitative PCR used to Assess HIV-1 Integration and 2-LTR Circle Formation in Human Macrophages, Peripheral Blood Lymphocytes and a CD4+ Cell Line. *Virol. J.* **7,** 354 (2010).
32. Lusic, M. & Siliciano, R. F. Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. *Nat. Rev. Microbiol.* (2016). doi:10.1038/nrmicro.2016.162
33. Bell, N. M. & Lever, A. M. L. HIV Gag polyprotein: processing and early viral particle assembly. *Trends Microbiol.* **21,** 136–44 (2013).
34. Freed, E. O. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat. Rev. Microbiol.* **13,** 484–496 (2015).
35. Barré-Sinoussi, F., Ross, A. L. & Delfraissy, J.-F. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat. Rev. Microbiol.* **11,** 877–883 (2013).
36. Pierson, T., McArthur, J. & Siliciano, R. F. Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annu. Rev. Immunol.* **18,** 665–708 (2000).
37. Descours, B. *et al.* CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses. *Nature* (2017). doi:10.1038/nature21710
38. Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* **137,** 1142–62 (1973).
39. Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J. Exp. Med.* **139,** 380–97 (1974).
40. Nussenzweig, M. C. Dendritic cells are accessory cells for the development of anti- trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **152,** 1070–1084 (1980).
41. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392,** 245–252 (1998).
42. Belz, G. T. & Nutt, S. L. Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat. Rev. Immunol.* **12,** 101–13 (2012).
43. Guilliams, M. *et al.* Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity* **45,** 669–684 (2016).
44. Puhr, S., Lee, J., Zvezdova, E., Zhou, Y. J. & Liu, K. Dendritic cell development-History, advances, and open questions. *Semin. Immunol.* **27,** 388–396 (2015).
45. Worah, K. *et al.* Proteomics of Human Dendritic Cell Subsets Reveals Subset-Specific Surface Markers and Differential Inflammasome Function. *Cell Rep.* **16,** 2953–2966 (2016).
46. Capucha, T. *et al.* Distinct Murine Mucosal Langerhans Cell Subsets Develop from Pre-dendritic Cells and Monocytes. *Immunity* **43,** 369–381 (2015).
47. Guilliams, M. *et al.* Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* **14,** 571–578 (2014).
48. Carpentier, S. *et al.* Comparative genomics analysis of mononuclear phagocyte subsets con fi rms homology between lymphoid tissue-resident and dermal XCR1 + DCs in mouse and human and distinguishes them from Langerhans cells. *J. Immunol. Methods* **432,** 35–49 (2016).
49. Vu Manh, T. P., Bertho, N., Hosmalin, A., Schwaztz-Cornil, I. & Dalod, M. Investigating evolutionary conservation of dendritic cell. *Front. Immunol.* **6,** 17 (2015).
50. Schmitt, N., Cumont, M., Scott-algara, D., Israe, N. & Hurtrel, B. Ex vivo characterization of human thymic dendritic cell subsets. **212,** 167–177 (2007).
51. Dzionek, A. *et al.* BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: Three Markers for Distinct Subsets of Dendritic Cells in Human Peripheral Blood. *J Immunol* (2000). doi:10.4049/jimmunol.165.11.6037
52. 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).
53. Liu, Y.-J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* **23,** 275–306 (2005).
54. Tamoutounour, S. *et al.* Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* **39,** 925–938 (2013).
55. Merad, M., Ginhoux, F. & Collin, M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* **8,** 935–47 (2008).
56. Tang, A., Amagai, M., Granger, L. G., Stanley, J. R. & Udey, M. C. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* **361,** 82–5 (1993).

57. Valladeau, J. *et al.* Langerin, a Novel C-Type Lectin Specific to Langerhans Cells, Is an Endocytic Receptor that Induces the Formation of Birbeck Granules. *Immunity* **12,** 71–81 (2000).
58. León, B. & Ardavín, C. Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunol. Cell Biol.* **86,** 320–4 (2008).
59. Randolph, G., Beaulie, S., Lebecque, S., Steinman, R. M. & Muller, W. A. Differentiation of Monocytes into Dendritic Cells in a Model of Transendothelial Trafficking. *Science (80-.).* **282,** 16–19 (1998).
60. Cheong, C. *et al.* Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* **143,** 416–29 (2010).
61. Figdor, C. G., de Vries, I. J. M., Lesterhuis, W. J. & Melief, C. J. M. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat. Med.* **10,** 475–480 (2004).
62. Romani, B. N. *et al.* Proliferating Dendritic Cell Progenitors in Human Blood. *J. Exp. Med.* **180,** (1994).
63. Sallusto, B. F. & Lanzavecchia, A. Efficient Presentation of Soluble Antigen by Cultured Human Dendritic Cells Is Maintained by Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor Plus Iuterleukin 4 and Downregulated by Tumor Necrosis Factor alpha. *J. Exp. Med.* **179,** (1994).
64. Crozat, K., Vivier, E. & Dalod, M. Crosstalk between components of the innate immune system: Promoting anti-microbial defenses and avoiding immunopathologies. *Immunol. Rev.* **227,** 129–149 (2009).
65. Kawai, T. & Akira, S. TLR signaling. *Semin. Immunol.* **19,** 24–32 (2006).
66. Kawai, T. & Akira, S. Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J. Biochem.* **141,** 137–145 (2007).
67. Gay, N. J. & Gangloff, M. Structure and Function of Toll Receptors and Their Ligands. *Annu. Rev. Biochem.* **76,** 141–165 (2007).
68. Heil, F. & Bauer, S. Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like. *Science (80-.).* **1526,** 4–8 (2004).
69. Bauer, S. *et al.* Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98,** 9237–42 (2001).
70. Sirard, J. C., Vignal, C., Dessein, R. & Chamaillard, M. Nod-like receptors: Cytosolic watchdogs for immunity against pathogens. *PLoS Pathog.* **3,** 1829–1836 (2007).
71. Schwarz, H. *et al.* TLR8 and NOD signaling synergistically induce the production of IL-1?? and IL-23 in monocyte-derived DCs and enhance the expression of the feedback inhibitor SOCS2. *Immunobiology* **218,** 533–542 (2013).
72. Cooney, R. *et al.* NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat. Med.* **16,** 90–7 (2010).
73. Bruni, D. *et al.* Viral entry route determines how human plasmacytoid dendritic cells produce type I interferons. *Sci. Signal.* **8,** ra25–ra25 (2015).
74. Dixit, E. & Kagan, J. C. *Intracellular Pathogen Detection by RIG-I-Like Receptors*. *Advances in Immunology* **117,** (Elsevier Inc., 2013).
75. Gack, M. U. *et al.* TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* **446,** 916–920 (2007).
76. Drickamer, K. & Taylor, M. E. Biology of Animal Lectins. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9,** 237–264 (1993).
77. Mascanfroni, I. D. *et al.* Endogenous lectins shape the function of dendritic cells and tailor adaptive immunity: Mechanisms and biomedical applications. *International Immunopharmacology* **11,** 831–838 (2011).
78. Gupta, G. S. *Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications*. (Springer Vienna, 2012). doi:10.1007/978-3-7091-1065-2
79. Chauhan, S. *et al.* TRIMs and Galectins Globally Cooperate and TRIM16 and Galectin-3 Co-direct Autophagy in Endomembrane Damage Homeostasis. *Dev. Cell* **39,** 13–27 (2016).
80. Thurston, T. L. M., Wandel, M. P., von Muhlinen, N., Foeglein, A. & Randow, F. Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* **482,** 414–8 (2012).
81. Crespo, H. J., Lau, J. T. Y. & Videira, P. A. Dendritic cells: A spot on sialic acid. *Front. Immunol.* **4,** 1–15 (2013).
82. Lock, K., Zhang, J., Lu, J., Lee, S. H. & Crocker, P. R. Expression of CD33-related siglecs on human mononuclear phagocytes, monocyte-derived dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells. *Immunobiology* **209,** 199–207 (2004).
83. Izquierdo-Useros, N. *et al.* Siglec-1 Is a Novel Dendritic Cell Receptor That Mediates HIV-1 Trans-Infection Through Recognition of Viral Membrane Gangliosides. *PLoS Biol.* **10,** (2012).
84. Pepys, M. B. & Hirschfield, G. M. C-reactive protein : a critical update. *J. Clin. Invest.* **111,** 1805–1812 (2003).
85. Figdor, C. G., Kooyk, Y. Van & Adema, G. J. C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells.

Nat. Rev. Immunol. **2,** (2002).
86. Drickamer, K. & Taylor, M. E. Recent insights into structures and functions of C-type lectins in the immune system. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **34,** 26–34 (2015).
87. Mayer, S., Raulf, M.-K. & Lepenies, B. C-type lectins: their network and roles in immunity/pathogen recognition. *Histochem Cell Biol* **in press,** 223–237 (2017).
88. Zelensky, A. N. & Gready, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily. **272,** 6179–6217 (2005).
89. van Vliet, S. J., García-Vallejo, J. J. & van Kooyk, Y. Dendritic cells and C-type lectin receptors: coupling innate to adaptive immune responses. *Immunol. Cell Biol.* **86,** 580–587 (2008).
90. Drickamer, K. Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. *Nature* **360,** 183–186 (1992).
91. Moris, A. *et al.* DC-SIGN promotes exogenous MHC-I-restricted HIV-1 antigen presentation. *Blood* **103,** 2648–2654 (2004).
92. Moris, A. *et al.* Dendritic cells and HIV-specific CD4. *Blood* **108Moris, ,** 1643–1651 (2006).
93. Geijtenbeek, T. B. H. & Gringhuis, S. I. C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **16,** 433–48 (2016).
94. Deng, Z. *et al.* Tyrosine phosphatase SHP-2 mediates C-type lectin receptor-induced activation of the kinase Syk and anti-fungal TH17 responses. *Nat. Immunol.* **16,** 642–52 (2015).
95. Yonekawa, A. *et al.* Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria. *Immunity* **41,** 402–413 (2014).
96. Gringhuis, S. I. *et al.* Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncannonical NK-kB activation through Raf-1 and Syk. *Nat. Immunol.* **10,** 203–213 (2009).
97. Fuller, G. L. J. *et al.* The C-type lectin receptors CLEC-2 and Dectin-1, but not DC-SIGN, signal via a novel YXXL-dependent signaling cascade. *J. Biol. Chem.* **282,** 12397–12409 (2007).
98. Röck, J. *et al.* CD303 (BDCA-2) signals in plasmacytoid dendritic cellsvia a BCR-like signalosome involving Syk, Slp65 and PLCγ2. *Eur. J. Immunol.* **37,** 3564–3575 (2007).
99. Bates, E. E. *et al.* APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J. Immunol.* **163,** 1973–83 (1999).
100. Kanazawa, N., Tashiro, K. & Miyachi, Y. Signaling and immune regulatory role of the dendritic cell immunoreceptor (DCIR) family lectins: DCIR, DCAR, dectin-2 and BDCA-2. *Immunobiology* **209,** 179–190 (2004).
101. Richard, M., Thibault, N. & Veilleux, P. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor reduces the affinity of SHP-2 for the ITIM of CLECSF6 in neutrophils : A new mechanism of action for SHP-2. **43,** 1716–1721 (2006).
102. Lambert, A. A., Barabé, F., Gilbert, C. & Tremblay, M. J. DCIR-mediated enhancement of HIV-1 infection requires the ITIM-associated signal transduction pathway. *Blood* **117,** 6589–6599 (2011).
103. Geijtenbeek, T. B. H. *et al.* Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* **100,** 575–585 (2000).
104. Geijtenbeek, T. B. H. *et al.* DC-SIGN–ICAM-2 interaction medi- ates dendritic cell trafficking. *Nat. Immunol.* **1,** 353–357 (2000).
105. Geijtenbeek, T. B. *et al.* DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100,** 587–597 (2000).
106. Relloso, M. *et al.* DC-SIGN (CD209) Expression Is IL-4 Dependent and Is Negatively Regulated by IFN, TGF- , and Anti-Inflammatory Agents. *J. Immunol.* **168,** 2634–2643 (2002).
107. van Kooyk, Y. & Geijtenbeek, T. B. H. DC-sign: Escape mechanism for pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **3,** 697–709 (2003).
108. dos Santos, Á. *et al.* Oligomerization domains in the glycan-binding receptors DC-SIGN and DC-SIGNR: Sequence variation and stability differences. *Protein Sci.* **26,** 306–316 (2017).
109. Mitchell, D. A., Fadden, A. J. & Drickamer, K. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J. Biol. Chem.* **276,** 28939–28945 (2001).
110. van Liempt, E. *et al.* Specificity of DC-SIGN for mannose- and fucose-containing glycans. *FEBS Lett.* **580,** 6123–6131 (2006).
111. Gringhuis, S. I., Kaptein, T. M., Wevers, B. A., Mesman, A. W. & Geijtenbeek, T. B. H. Fucose-specific DC-SIGN signalling directs T helper cell type-2 responses via IKKε- and CYLD-dependent Bcl3 activation. *Nat. Commun.* **5,** 3898 (2014).
112. Chatwell, L., Holla, A., Kaufer, B. B. & Skerra, A. The carbohydrate recognition domain of Langerin reveals high structural similarity with the one of DC-SIGN but an additional , calcium-independent sugar-binding site. **45,** 1981–1994 (2008).

113. Geijtenbeek, T. B., Den Dunnen, J. & Gringhuis, S. I. Pathogen recognition by DC-SIGN shapes adaptive immunity. *Future Microbiol.* **4,** 879–90 (2009).
114. Manzo, C. *et al.* The neck region of the C-type lectin DC-SIGN regulates its surface spatiotemporal organization and virus-binding capacity on antigen-presenting cells. *J. Biol. Chem.* **287,** 38946–38955 (2012).
115. Feinberg, H., Guo, Y., Mitchell, D. A., Drickamer, K. & Weis, W. I. Extended neck regions stabilize tetramers of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *J. Biol. Chem.* **280,** 1327–35 (2005).
116. Guo, Y. *et al.* Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. **11,** 591–598 (2004).
117. Engering, A. *et al.* The Dendritic Cell-Specific Adhesion Receptor DC-SIGN Internalizes Antigen for Presentation to T Cells. *J. Immunol.* **168,** 2118–2126 (2002).
118. Lozach, P. Y. *et al.* Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J. Biol. Chem.* **280,** 23698–23708 (2005).
119. Azad, A. K., Torrelles, J. B. & Schlesinger, L. S. Mutation in the DC-SIGN cytoplasmic triacidic cluster motif markedly attenuates receptor activity for phagocytosis and endocytosis of mannose-containing ligands by human myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* **84,** 1594–603 (2008).
120. Gillespie, L. *et al.* Endocytic function is critical for influenza A virus infection via DC- SIGN and L-SIGN. *Nat. Publ. Gr.* 1–11 (2016). doi:10.1038/srep19428
121. Nobile, C., Moris, A., Porrot, F., Sol-Foulon, N. & Schwartz, O. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated fusion by DC-SIGN. *J. Virol.* **77,** 5313–23 (2003).
122. Mahnke, K. *et al.* The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J. Cell Biol.* **151,** 673–84 (2000).
123. Tailleux, L. *et al.* DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **197,** 121–127 (2003).
124. Geijtenbeek, T. B. H. *et al.* Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J. Exp. Med.* **197,** 7–17 (2003).
125. Gringhuis, S. I. *et al.* C-Type Lectin DC-SIGN Modulates Toll-like Receptor Signaling via Raf-1 Kinase-Dependent Acetylation of Transcription Factor NF-kB. *Immunity* **26,** 605–616 (2007).
126. Gringhuis, S. I. & Geijtenbeek, T. B. H. Carbohydrate signaling by C-type lectin DC-SIGN affects NF-κB activity. *Methods Enzymol.* **480,** 151–164 (2010).
127. Gringhuis, S. I. I. *et al.* Carbohydrate-specific signaling through the DC-SIGN signalosome tailors immunity to Mycobacterium tuberculosis, HIV-1 and Helicobacter pylori. *Nat. Immunol.* **10,** 0–8 (2009).
128. Gringhuis, S. I. *et al.* HIV-1 exploits innate signaling by TLR8 and DC-SIGN for productive infection of dendritic cells. *Nat Immunol* **11,** 419–426 (2010).
129. Caparros, E. DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. *Blood* **107,** 3950–3958 (2006).
130. Smith, A. L. *et al.* Leukocyte-specifi c protein 1 interacts with DC-SIGN and mediates transport of HIV to the proteasome in dendritic cells. **204,** (2007).
131. Ribeiro, C. M. S. *et al.* Receptor usage dictates HIV-1 restriction by human TRIM5α in dendritic cell subsets. *Nature* **01,** (2016).
132. Hodges, A. *et al.* Activation of the lectin DC-SIGN induces an immature dendritic cell phenotype triggering Rho-GTPase activity required for HIV-1 replication. *Nat. Immunol.* **8,** 569–577 (2007).
133. Nikolic, D. S. *et al.* HIV-1 activates Cdc42 and induces membrane extensions in immature dendritic cells to facilitate cell-to-cell virus propagation. **118,** 4841–4853 (2011).
134. Geijtenbeek, T. B. H. & Gringhuis, S. I. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **9,** 465–79 (2009).
135. Luzio, J. P., Pryor, P. R. & Bright, N. A. Lysosomes: fusion and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8,** 622–32 (2007).
136. Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I. & Trombetta, E. S. Differential Lysosomal Proteolysis in Antigen-Presenting Cells Determines Antigen Fate. *Science (80-.).* **307,** 1630–1634 (2005).
137. Conner, S. D. & Schmid, S. L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422,** 37–44 (2003).
138. Cambi, A., Beeren, I., Joosten, B., Fransen, J. A. & Figdor, C. G. The C-type lectin DC-SIGN internalizes soluble antigens and HIV-1 virions via a clathrin-dependent mechanism. 1923–1928 (2009). doi:10.1002/eji.200939351
139. Tacken, P. J. *et al.* Targeting DC-SIGN via its neck region leads to prolonged antigen residence in early endosomes, delayed lysosomal degradation, and cross-presentation. *Blood* **118,** 4111–4119 (2011).

140. Klionsky, D. J., Eskelinen, E. L. & Deretic, V. Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... Wait, I'm confused. *Autophagy* **10,** 549–551 (2014).
141. Kwon, D. S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W. A. & Littman, D. R. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* **16,** 135–144 (2002).
142. Turville, S. G. *et al.* Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* **103,** 2170–2179 (2004).
143. Hofmann, H. & Pöhlmann, S. DC-SIGN: Access portal for sweet viral killers. *Cell Host Microbe* **10,** 5–7 (2011).
144. Zerial, M. & Mcbride, H. RAB PROTEINS AS MEMBRANE ORGANIZERS. **2,** (2001).
145. Sousa, C. R. e. Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* **6,** 476–483 (2006).
146. Roche, P. a & Furuta, K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **15,** 203–216 (2015).
147. Worbs, T., Hammerschmidt, S. I. & Förster, R. Dendritic cell migration in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* (2016). doi:10.1038/nri.2016.116
148. Ni, K. & O'Neill, H. The role of dendritic cells in T cell activation. *Immunol. Cell Biol.* **75,** 223–230 (1997).
149. Blum, J. S., Wearsch, P. A. & Cresswell, P. Pathways of Antigen Processing. *Annu. Rev. Immunol.* **31,** 443–473 (2013).
150. Yewdell, J. W. Immunoproteasomes : Regulating the regulator. **102,** 9089–9090 (2005).
151. Kloetzel, P. M. Antigen processing by the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2,** 179–187 (2001).
152. Lee, M. J., Lee, J. H. & Rubinsztein, D. C. Tau degradation: The ubiquitin-proteasome system versus the autophagy-lysosome system. *Prog. Neurobiol.* **105,** 49–59 (2013).
153. Jongbloed, S. L. *et al.* Human CD141 + (BDCA-3) + dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med.* **207,** 1247–1260 (2010).
154. Tel, J. *et al.* Human plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-present exogenous Ags to CD8+ T cells despite lower Ag uptake than myeloid dendritic cell subsets. *Blood* **121,** 459–467 (2013).
155. Hoeffel, G. *et al.* Antigen Crosspresentation by Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity* **27,** 481–492 (2007).
156. Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A. & Amigorena, S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* **12,** 557–569 (2012).
157. Pieters, J. MHC class II-restricted antigen processing and presentation. *Adv. Immunol.* **75,** 159–208 (2000).
158. Blanchet, F. P. *et al.* Human immunodeficiency virus-1 inhibition of immunoamphisomes in dendritic cells impairs early innate and adaptive immune responses. *Immunity* **32,** 654–669 (2010).
159. Coulon, P. *et al.* HIV-Infected Dendritic Cells Present Endogenous MHC Class II − Restricted Antigens to HIV-Specific CD4 + T Cells. *J. Immunol.* **197,** 517–532 (2016).
160. Huppa, J. B. & Davis, M. M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* **3,** 973–983 (2003).
161. Ridge, J. P., Di Rosa, F. & Matzinger, P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* **393,** 474–8 (1998).
162. Clatza, A., Bonifaz, L. C., Vignali, D. A. A. & Moreno, J. CD40-induced aggregation of MHC class II and CD80 on the cell surface leads to an early enhancement in antigen presentation. *J. Immunol.* **171,** 6478–87 (2003).
163. Grakoui, A. *et al.* The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation. *Science (80-.).* **285,** 221–227 (1999).
164. Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3,** 133–146 (2003).
165. Dong, C. & Flavell, R. A. Cell fate decision: T-helper 1 and 2 subsets in immune responses. *Arthritis Res.* **2,** 179 (2000).
166. Bettelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441,** 235–238 (2006).
167. Turville, S., Wilkinson, J., Cameron, P., Dable, J. & Cunningham, A. L. The role of dendritic cell C-type lectin receptors in HIV pathogenesis. *J. Leukoc. Biol.* **74,** 710–8 (2003).
168. Wu, L. & KewalRamani, V. N. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat. Rev. Immunol.* **6,** 859–68 (2006).
169. de Witte, L. *et al.* Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat. Med.* **13,** 367–371 (2007).
170. Smed-sörensen, A. *et al.* Differential Susceptibility to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection of Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells Differential Susceptibility to Human Immunodeficiency Virus

Type 1 Infection of Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells. *J. Virol.* **79,** 8861–8869 (2005).
171. Granelli-Piperno, A., Shimeliovich, I., Pack, M., Trumpfheller, C. & Steinman, R. M. HIV-1 Selectively Infects a Subset of Nonmaturing BDCA1-Positive Dendritic Cells in Human Blood. *J. Immunol.* **176,** 991–998 (2006).
172. Nobile, C. *et al.* Covert Human Immunodeficiency Virus Replication in Dendritic Cells and in DC-SIGN-Expressing Cells Promotes Long-Term Transmission to Lymphocytes Covert Human Immunodeficiency Virus Replication in Dendritic Cells and in DC-SIGN-Expressing Cells Promotes L. **79,** 5386–5399 (2005).
173. Miller, E. Dendritic cell dysregulation during HIV-1 infection. **254,** 170–189 (2013).
174. Knight, S. C., Macatonia, S. E. & Patterson, S. HIV I infection of dendritic cells. *Int. Rev. Immunol.* **6,** 163–75 (1990).
175. McIlroy, D. *et al.* Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *J. Virol.* **69,** 4737–45 (1995).
176. Dong, C., Janas, A. M., Wang, J.-H., Olson, W. J. & Wu, L. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 replication in immature and mature dendritic cells reveals dissociable cis- and trans-infection. *J. Virol.* **81,** 11352–62 (2007).
177. Megiovanni, A. M., Sanchez, F., Gluckman, J. C. & Rosenzwajg, M. Double-stranded RNA stimulation or CD40 ligation of monocyte-derived dendritic cells as models to study their activation and maturation process. *Eur. Cytokine Netw.* **15,** 126–34 (2004).
178. Granelli-Piperno, A., Golebiowska, A., Trumpfheller, C., Siegal, F. P. & Steinman, R. M. HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101,** 7669–74 (2004).
179. Hertoghs, N. *et al.* SAMHD1 Degradation Enhances Active Suppression of Dendritic Cell Maturation by HIV-1. *J Immunol* **194,** 4431–4437 (2015).
180. Cavrois, M. *et al.* Human Immunodeficiency Virus Fusion to Dendritic Cells Declines as Cells Mature. *J. Virol.* **80,** 1992–1999 (2006).
181. Izquierdo-Useros, N. *et al.* Maturation of blood-derived dendritic cells enhances human immunodeficiency virus type 1 capture and transmission. *J. Virol.* **81,** 7559–7570 (2007).
182. Izquierdo-Useros, N. *et al.* HIV-1 Capture and Transmission by Dendritic Cells: The Role of Viral Glycolipids and the Cellular Receptor Siglec-1. *PLoS Pathog.* **10,** (2014).
183. Blauvelt, A. *et al.* Productive infection of dendritic cells by HIV-1 and their ability to capture virus are mediated through separate pathways. *J. Clin. Invest.* **100,** 2043–2053 (1997).
184. Yan, N. & Lieberman, J. Gaining a foothold: How HIV avoids innate immune recognition. *Curr. Opin. Immunol.* **23,** 21–28 (2011).
185. Turville, S. G. *et al.* Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat. Immunol.* **3,** 975–983 (2002).
186. Boggiano, C., Manel, N. & Littman, D. R. Dendritic cell-mediated trans-enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity is independent of DC-SIGN. *J. Virol.* **81,** 2519–2523 (2007).
187. Gummuluru, S., Rogel, M., Stamatatos, L. & Emerman, M. Binding of Human Immunodeficiency Virus Type 1 to Immature Dendritic Cells Can Occur Independently of DC-SIGN and Mannose Binding C-Type Lectin Receptors via a Cholesterol-Dependent Pathway. *J. Virol.* **77,** 12865–12874 (2003).
188. Arrighi, J.-F. *et al.* DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *J. Exp. Med.* **200,** 1279–88 (2004).
189. Czubala, M. A. *et al.* TGF?? Induces a SAMHD1-Independent Post-Entry Restriction to HIV-1 Infection of??Human Epithelial Langerhans Cells. *J. Invest. Dermatol.* **136,** 1981–1989 (2016).
190. van den Berg, L. M. *et al.* Caveolin-1 mediated uptake via langerin restricts HIV-1 infection in human Langerhans cells. *Retrovirology* **11,** 3903 (2014).
191. García-Vallejo, J. J. *et al.* The consequences of multiple simultaneous C-type lectin-ligand interactions: DCIR alters the endo-lysosomal routing of DC-SIGN. *Front. Immunol.* **6,** 1–12 (2015).
192. Nguyen, D. G. & Hildreth, J. E. K. Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages. *Eur. J. Immunol.* **33,** 483–93 (2003).
193. Søndergaard, J. N., Vinner, L. & Brix, S. Natural mannosylation of HIV-1 gp120 imposes no immunoregulatory effects in primary human plasmacytoid dendritic cells. *Mol. Immunol.* **59,** 180–187 (2014).
194. Lambert, A. A., Gilbert, C., Richard, M., Beaulieu, A. D. & Tremblay, M. J. The C-type lectin surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and contributes to trans- and cis-infection pathways. *Blood* **112,** 1299–307 (2008).
195. Manches, O., Frleta, D. & Bhardwaj, N. Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection. *Trends Immunol.* **35,** 114–22 (2014).

196. Hong, P. W.-P. *et al.* Human immunodeficiency virus envelope (gp120) binding to DC-SIGN and primary dendritic cells is carbohydrate dependent but does not involve 2G12 or cyanovirin binding sites: implications for structural analyses of gp120-DC-SIGN binding. *J. Virol.* **76,** 12855–65 (2002).
197. Ceccaldi, P.-E. *et al.* DC-SIGN facilitates fusion of dendritic cells with human T-cell leukemia virus type 1-infected cells. *J. Virol.* **80,** 4771–80 (2006).
198. Pöhlmann, S. *et al.* DC-SIGN interactions with human immunodeficiency virus type 1 and 2 and simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* **75,** 4664–72 (2001).
199. Lee, B. *et al.* cis Expression of DC-SIGN allows for more efficient entry of human and simian immunodeficiency viruses via CD4 and a coreceptor. *J. Virol.* **75,** 12028–38 (2001).
200. Wang, J.-H., Janas, A. M., Olson, W. J., KewalRamani, V. N. & Wu, L. CD4 coexpression regulates DC-SIGN-mediated transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **81,** 2497–507 (2007).
201. Garcia, E. *et al.* HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. *Traffic* **6,** 488–501 (2005).
202. Levine, B., Mizushima, N. & Virgin, H. W. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* **469,** 323–335 (2011).
203. Wiley, R. D. & Gummuluru, S. Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103,** 738–743 (2006).
204. Cameron, P. U. *et al.* Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. *Science* **257,** 383–7 (1992).
205. Wu, L., Martin, T. D., Carrington, M. & KewalRamani, V. N. Raji B cells, misidentified as THP-1 cells, stimulate DC-SIGN-mediated HIV transmission. *Virology* **318,** 17–23 (2004).
206. Trumpfheller, C., Park, C. G., Finke, J., Steinman, R. M. & Granelli-Piperno, A. Cell type-dependent retention and transmission of HIV-1 by DC-SIGN. *Int. Immunol.* **15,** 289–98 (2003).
207. de Witte, L., Nabatov, A. & Geijtenbeek, T. B. H. Distinct roles for DC-SIGN+-dendritic cells and Langerhans cells in HIV-1 transmission. *Trends Mol. Med.* **14,** 12–19 (2008).
208. Mikulak, J., Di Vito, C., Zaghi, E. & Mavilio, D. Host immune responses in HIV-1 infection: The emerging pathogenic role of siglecs and their clinical correlates. *Front. Immunol.* **8,** 1–11 (2017).
209. Rodriguez-Plata, M. T. *et al.* HIV-1 capture and antigen presentation by dendritic cells: enhanced viral capture does not correlate with better T cell activation. *J. Immunol.* **188,** 6036–45 (2012).
210. Varchetta, S. *et al.* Sialic acid-binding Ig-like lectin-7 interacts with HIV-1 gp120 and facilitates infection of CD4pos T cells and macrophages. *Retrovirology* **10,** 154 (2013).
211. McDonald, D. *et al.* Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* **300,** 1295–7 (2003).
212. Jolly, C., Kashefi, K., Hollinshead, M. & Sattentau, Q. J. HIV-1 Cell to Cell Transfer across an Env-induced, Actin-dependent Synapse. *J. Exp. Med.* **199,** 283–293 (2004).
213. Wang, J.-H., Kwas, C. & Wu, L. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), but not ICAM-2 and -3, is important for dendritic cell-mediated human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J. Virol.* **83,** 4195–204 (2009).
214. Jolly, C., Mitar, I. & Sattentau, Q. J. Adhesion molecule interactions facilitate human immunodeficiency virus type 1-induced virological synapse formation between T cells. *J. Virol.* **81,** 13916–21 (2007).
215. Jolly, C., Mitar, I. & Sattentau, Q. J. Requirement for an intact T-cell actin and tubulin cytoskeleton for efficient assembly and spread of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **81,** 5547–60 (2007).
216. Wu, L., Martin, T. D., Han, Y.-C., Breun, S. K. & KewalRamani, V. N. No Title. *Retrovirology* **1,** 14 (2004).
217. Piguet, V. & Sattentau, Q. Dangerous liaisons at the virological synapse. *J. Clin. Invest.* **114,** 605–610 (2004).
218. Sol-Foulon, N. *et al.* HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread. *Immunity* **16,** 145–155 (2002).
219. Lehmann, M., Nikolic, D. S. & Piguet, V. How HIV-1 takes advantage of the cytoskeleton during replication and cell-to-cell transmission. *Viruses* **3,** 1757–1776 (2011).
220. Chen, P., Hübner, W., Spinelli, M. A. & Chen, B. K. Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses. *J. Virol.* **81,** 12582–95 (2007).
221. Sourisseau, M., Sol-Foulon, N., Porrot, F., Blanchet, F. & Schwartz, O. Inefficient human immunodeficiency virus replication in mobile lymphocytes. *J. Virol.* **81,** 1000–12 (2007).
222. Schiffner, T., Sattentau, Q. J. & Duncan, C. J. A. Cell-to-cell spread of HIV-1 and evasion of neutralizing antibodies. *Vaccine* **31,** 5789–97 (2013).
223. Sewald, X. *et al.* Retroviruses use CD169-mediated trans-infection of permissive lymphocytes to establish infection. *Science* **350,** 563–7 (2015).

224. Izquierdo-Useros, N. *et al.* Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway. *Blood* **113,** 2732–2741 (2009).
225. Garcia, E., Nikolic, D. S. & Piguet, V. HIV-1 replication in dendritic cells occurs through a tetraspanin-containing compartment enriched in AP-3. *Traffic* **9,** 200–214 (2008).
226. Yu, H. J., Reuter, M. A. & McDonald, D. HIV traffics through a specialized, surface-accessible intracellular compartment during trans-infection of T cells by mature dendritic cells. *PLoS Pathog.* **4,** e1000134 (2008).
227. Marsh, M. & Helenius, A. Virus entry: Open sesame. *Cell* **124,** 729–740 (2006).
228. Cavrois, M., Neidleman, J., Kreisberg, J. F. & Greene, W. C. In vitro derived dendritic cells trans-infect CD4 T cells primarily with surface-bound HIV-1 virions. *PLoS Pathog.* **3,** 0038–0045 (2007).
229. Kramer, B. *et al.* HIV interaction with endosomes in macrophages and dendritic cells. *Blood Cells, Mol. Dis.* **35,** 136–142 (2005).
230. Pelchen-Matthews, A., Kramer, B. & Marsh, M. Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J. Cell Biol.* **162,** 443–455 (2003).
231. Cardinaud, S. *et al.* Triggering of TLR-3, -4, NOD2 and DC-SIGN reduces viral replication and increases T-cell activation capacity of HIV-infected human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* (2017). doi:10.1002/eji.201646603
232. Beignon, A. S. *et al.* Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J. Clin. Invest.* **115,** 3265–3275 (2005).
233. Larange, A., Antonios, D., Pallardy, M. & Kerdine-ro, S. TLR7 and TLR8 agonists trigger different signaling pathways for human dendritic cell maturation role in bridging innate and adaptive immunity . molecular signatures of pathogens through TLRs . *J. Leukoc. Biol.* **85,** 673–683 (2009).
234. Harman, A. N. *et al.* HIV infection of dendritic cells subverts the IFN induction pathway via IRF-1 and inhibits type 1 IFN production. *Blood* **118,** 298–308 (2011).
235. van der Vlist, M., van der Aar, A. M. G., Gringhuis, S. I. & Geijtenbeek, T. B. H. Innate signaling in HIV-1 infection of dendritic cells. *Curr. Opin. HIV AIDS* **6,** 348–52 (2011).
236. Martinelli, E. *et al.* HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN-{alpha} secretion in plasmacytoid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104,** 3396–401 (2007).
237. Berg, R. K. *et al.* Genomic HIV RNA induces innate immune responses through RIG-I-dependent sensing of secondary-structured RNA. *PLoS One* **7,** 1–10 (2012).
238. Solis, M. *et al.* RIG-I-mediated antiviral signaling is inhibited in HIV-1 infection by a protease-mediated sequestration of RIG-I. *J. Virol.* **85,** 1224–1236 (2011).
239. Doyle, T., Goujon, C. & Malim, M. H. HIV-1 and interferons: who's interfering with whom? *Nat. Rev. Immunol.* **13,** 403–413 (2015).
240. Stremlau, M. *et al.* The cytoplasmic body component TRIM5α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* **427,** 848–853 (2004).
241. Yap, M. W., Nisole, S., Lynch, C. & Stoye, J. P. Trim5 protein restricts both HIV-1 and murine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101,** 10786–10791 (2004).
242. Sawyer, S. L., Wu, L. I., Emerman, M. & Malik, H. S. Positive selection of primate TRIM5 identifies a critical species-specific retroviral restriction domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102,** 2832–2837 (2005).
243. Stremlau, M. *et al.* Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5 restriction factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103,** 5514–5519 (2006).
244. Pertel, T. *et al.* TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. *Nature* **472,** 361–365 (2011).
245. Roa, A. *et al.* RING domain mutations uncouple TRIM5α restriction of HIV-1 from inhibition of reverse transcription and acceleration of uncoating. *J. Virol.* **86,** 1717–27 (2012).
246. Lienlaf, M. *et al.* Contribution of E3-ubiquitin ligase activity to HIV-1 restriction by TRIM5alpha(rh): structure of the RING domain of TRIM5alpha. *J. Virol.* **85,** 8725–37 (2011).
247. Danielson, C. M., Cianci, G. C. & Hope, T. J. Recruitment and dynamics of proteasome association with rhTRIM5α cytoplasmic complexes during HIV-1 infection. *Traffic* **13,** 1206–17 (2012).
248. Lukic, Z. *et al.* TRIM5α associates with proteasomal subunits in cells while in complex with HIV-1 virions. *Retrovirology* **8,** 93 (2011).
249. Mandell, M. A. *et al.* TRIM Proteins Regulate Autophagy and Can Target Autophagic Substrates by Direct Recognition. *Dev. Cell* **30,** 394–409 (2014).
250. Imam, S. *et al.* TRIM5α Degradation via Autophagy Is Not Required for Retroviral Restriction. *J. Virol.* **90,** 3400–3410 (2016).
251. Pacheco, B., Finzi, A., Stremlau, M. & Sodroski, J. Adaptation of HIV-1 to cells expressing rhesus monkey TRIM5α. *Virology* **408,** 204–212 (2010).
252. Yap, M. W., Nisole, S. & Stoye, J. P. A single amino acid change in the SPRY domain of human Trim5alpha

leads to HIV-1 restriction. *Curr. Biol.* **15,** 73–8 (2005).
253. Nisole, S., Stoye, J. P. & Saïb, A. TRIM Family Proteins: Retroviral Restriction and Antiviral Defence. *Nat. Rev. Microbiol.* **3,** 799–808 (2005).
254. Kimura, T. *et al.* TRIM-mediated precision autophagy targets cytoplasmic regulators of innate immunity. *J. Cell Biol.* **210,** 973–989 (2015).
255. Luban, J., Bossolt, K. L., Franke, E. K., Kalpana, G. V & Goff, S. P. Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* **73,** 1067–78 (1993).
256. Hatziioannou, T., Perez-Caballero, D., Cowan, S. & Bieniasz, P. D. Cyclophilin Interactions with Incoming Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsids with Opposing Effects on Infectivity in Human Cells. *J. Virol.* **79,** 176–183 (2005).
257. Grättinger, M. *et al.* In vitro assembly properties of wild-type and cyclophilin-binding defective human immunodeficiency virus capsid proteins in the presence and absence of cyclophilin A. *Virology* **257,** 247–60 (1999).
258. Manel, N. *et al.* A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells. *Nature* **467,** 214–7 (2010).
259. Hrecka, K. *et al.* Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* **474,** 658–661 (2011).
260. Laguette, N. *et al.* SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* **474,** 654–657 (2011).
261. Ryoo, J. *et al.* The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction. *Nat. Med.* **20,** 936–941 (2014).
262. Goldstone, D. C. *et al.* HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature* **480,** 379–82 (2011).
263. Ahn, J. *et al.* HIV/Simian Immunodeficiency Virus (SIV) Accessory Virulence Factor Vpx Loads the Host Cell Restriction Factor SAMHD1 onto the E3 Ubiquitin Ligase Complex CRL4DCAF1. *J. Biol. Chem.* **287,** 12550–12558 (2012).
264. Goujon, C. *et al.* SIVSM/HIV-2 Vpx proteins promote retroviral escape from a proteasome-dependent restriction pathway present in human dendritic cells. *Retrovirology* **4,** 2 (2007).
265. Browne, E. P., Allers, C. & Landau, N. R. Restriction of HIV-1 by APOBEC3G is cytidine deaminase-dependent. *Virology* **387,** 313–21 (2009).
266. Conticello, S. G., Thomas, C. J. F., Petersen-Mahrt, S. K. & Neuberger, M. S. Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. *Mol. Biol. Evol.* **22,** 367–77 (2005).
267. Moris, A., Murray, S. & Cardinaud, S. AID and APOBECs span the gap between innate and adaptive immunity. *Front. Microbiol.* **5,** 1–13 (2014).
268. Mohanram, V. *et al.* IFN- Induces APOBEC3G, F, and A in Immature Dendritic Cells and Limits HIV-1 Spread to CD4+ T Cells. *J. Immunol.* **190,** 3346–3353 (2013).
269. Pion, M. *et al.* APOBEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* **203,** 2887–2893 (2006).
270. Stopak, K., de Noronha, C., Yonemoto, W. & Greene, W. C. HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol. Cell* **12,** 591–601 (2003).
271. Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D. & Malim, M. H. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418,** 646–50 (2002).
272. Hultquist, J. F. *et al.* Human and rhesus APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, and APOBEC3H demonstrate a conserved capacity to restrict Vif-deficient HIV-1. *J. Virol.* **85,** 11220–34 (2011).
273. Sheehy, A. M., Gaddis, N. C. & Malim, M. H. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat. Med.* **9,** 1404–1407 (2003).
274. Yu, X. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science (80-.).* **302,** 1056–1060 (2003).
275. Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X. & Chen, Z. J. Cyclic GMP-AMP Synthase Is an. *Science (80-.).* **339,** 786–791 (2013).
276. Lahaye, X. *et al.* The Capsids of HIV-1 and HIV-2 Determine Immune Detection of the Viral cDNA by the Innate Sensor cGAS in Dendritic Cells. *Immunity* **39,** 1132–1142 (2013).
277. Jakobsen, M. R. *et al.* IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110,** E4571–80 (2013).
278. Monroe, K. M. *et al.* IFI16 DNA Sensor Is Required for Death of Lymphoid CD4 T Cells Abortively Infected with HIV. *Science (80-.).* **343,** 428–432 (2014).
279. Yan, N., Regalado-Magdos, A. D., Stiggelbout, B., Lee-Kirsch, M. A. & Lieberman, J. The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. *Nat.*

Immunol. **11,** 1005–13 (2010).
280. Tsang, J. *et al.* HIV-1 infection of macrophages is dependent on evasion of innate immune cellular activation. *AIDS* **23,** 2255–2263 (2009).
281. Blanchet, F. P. *et al.* TLR-4 engagement of dendritic cells confers a BST-2/tetherin-mediated restriction of HIV-1 infection to CD4+ T cells across the virological synapse. *Retrovirology* **10,** 6 (2013).
282. Yang, H. Structural insight into the mechanisms of enveloped virus tethering by tetherin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107,** 18428–18432 (2010).
283. Neil, S. J., Zang, T. & Bieniasz, P. D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* **451,** 425–430 (2008).
284. Van Damme, N. *et al.* The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe* **3,** 245–252 (2008).
285. Schubert, H. L. Structural and functional studies on the extracellular domain of BST2/tetherin in reduced and oxidized conformations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107,** 17951–17956 (2010).
286. Neil, S. J. D., Eastman, S. W., Jouvenet, N. & Bieniasz, P. D. HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog.* **2,** 354–367 (2006).
287. Mitchell, R. S. *et al.* Vpu antagonizes BST-2-mediated restriction of HIV-1 release via beta-TrCP and endo-lysosomal trafficking. *PLoS Pathog.* **5,** e1000450 (2009).
288. Van Damme, N. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe* **3,** 245–252 (2008).
289. Madjo, U. *et al.* LC3C Contributes to Vpu-Mediated Antagonism of BST2/Tetherin Restriction on HIV-1 Release through a Non-canonical Autophagy Pathway. *Cell Rep.* **17,** 2221–2233 (2016).
290. Tokarev, A. *et al.* Stimulation of NF- B Activity by the HIV Restriction Factor BST2. *J. Virol.* **87,** 2046–2057 (2013).
291. Ayinde, D. *et al.* SAMHD1 limits HIV-1 antigen presentation by monocyte-derived dendritic cells. *J. Virol.* **89,** JVI.00069–15 (2015).
292. Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. & Ohsumi, Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.* **119,** 301–11 (1992).
293. Thumm, M. *et al.* Isolation of autophagocytosis mutants of Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Lett.* **349,** 275–80 (1994).
294. Tsukada, M. & Ohsumi, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Lett.* **333,** 169–74 (1993).
295. Tanida, I. Autophagy basics. *Microbiol. Immunol.* **55,** 1–11 (2011).
296. MacVicar, T. Mitophagy. *Essays Biochem.* **55,** 93–104 (2013).
297. Singh, R. & Cuervo, A. M. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab.* **13,** 495–504 (2011).
298. Carroll, B., Hewitt, G. & Korolchuk, V. I. Autophagy and ageing: implications for age-related neurodegenerative diseases. *Essays Biochem.* **55,** 119–31 (2013).
299. Fulda, S. Autophagy and cell death. *Autophagy* **8,** 1250–1251 (2012).
300. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27,** 107–132 (2011).
301. Ferguson, T. A. & Green, D. R. Autophagy and phagocytosis converge for better vision. *Autophagy* **10,** 165–167 (2014).
302. Santambrogio, L. & Cuervo, A. M. Chasing the elusive mammalian microautophagy. *Autophagy* **7,** 652–654 (2011).
303. Cuervo, A. M. Chaperone-mediated autophagy: Dice's 'wild' idea about lysosomal selectivity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12,** 535–541 (2011).
304. Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149,** 274–93 (2012).
305. Egan, D. F. *et al.* Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* **331,** 456–61 (2011).
306. Nazio, F. *et al.* mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nat. Cell Biol.* **15,** 406–16 (2013).
307. McAlpine, F., Williamson, L. E., Tooze, S. A. & Chan, E. Y. W. Regulation of nutrient-sensitive autophagy by uncoordinated 51-like kinases 1 and 2. *Autophagy* **9,** 361–373 (2013).
308. Rubinsztein, D. C., Shpilka, T. & Elazar, Z. Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr. Biol.* **22,** R29–34 (2012).
309. Suzuki, K. *et al.* The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.* **20,** 5971–81 (2001).
310. Gallagher, L. E. & Chan, E. Y. W. Early signalling events of autophagy. *Essays Biochem.* **55,** 1–15 (2013).
311. Zhong, Y. *et al.* Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin

1–phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat. Cell Biol.* **11,** 468–476 (2009).
312. Russell, R. C. *et al.* ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat. Cell Biol.* **15,** 741–50 (2013).
313. Jaber, N. & Zong, W.-X. Class III PI3K Vps34: essential roles in autophagy, endocytosis, and heart and liver function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1280,** 48–51 (2013).
314. Itakura, E. & Mizushima, N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* **6,** 764–76 (2010).
315. Müller, A. J. & Proikas-Cezanne, T. Function of human WIPI proteins in autophagosomal rejuvenation of endomembranes? *FEBS Lett.* **589,** 1546–1551 (2015).
316. Liang, C. *et al.* Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat. Cell Biol.* **8,** 688–99 (2006).
317. Takahashi, Y. *et al.* Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy. *Autophagy* **7,** 61–73 (2011).
318. Sun, Q. *et al.* The RUN Domain of Rubicon Is Important for hVps34 Binding, Lipid Kinase Inhibition, and Autophagy Suppression. *J. Biol. Chem.* **286,** 185–191 (2011).
319. Pattingre, S. *et al.* Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122,** 927–39 (2005).
320. Roberts, R. & Ktistakis, N. T. Omegasomes: PI3P platforms that manufacture autophagosomes. *Essays Biochem* **55,** 17–27 (2013).
321. Proikas-Cezanne, T., Takacs, Z., Donnes, P. & Kohlbacher, O. WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. *J Cell Sci* **128,** 207–217 (2015).
322. Mizushima, N. *et al.* A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395,** 395–8 (1998).
323. Kabeya, Y. *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* **19,** SUPH?SUPV (2000).
324. Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12,** 1–222 (2016).
325. Reggiori, F., Tucker, K. A., Stromhaug, P. E. & Klionsky, D. J. The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Dev. Cell* **6,** 79–90 (2004).
326. Lang, T., Reiche, S., Straub, M., Bredschneider, M. & Thumm, M. Autophagy and the cvt Pathway Both Depend on AUT9. *J. Bacteriol.* **182,** 2125–2133 (2000).
327. Noda, T. *et al.* Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *J. Cell Biol.* **148,** 465–80 (2000).
328. Young, A. R. J. *et al.* Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J. Cell Sci.* **119,** 3888–3900 (2006).
329. Orsi, A. *et al.* Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol Biol Cell* **23,** 1860–1873 (2012).
330. Puri, C., Renna, M., Bento, C. F., Moreau, K. & Rubinsztein, D. C. Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes. *Cell* **154,** 1285–1299 (2013).
331. Lamb, C. A., Yoshimori, T. & Tooze, S. A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14,** 759–774 (2013).
332. Axe, E. L. *et al.* Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **182,** 685–701 (2008).
333. Hamasaki, M. *et al.* Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* **495,** 389–93 (2013).
334. Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C. & Rubinsztein, D. C. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol* **12,** 747–757 (2010).
335. Moreau, K., Ravikumar, B., Puri, C. & Rubinsztein, D. C. Arf6 promotes autophagosome formation via effects on phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phospholipase D. *J. Cell Biol.* **196,** 483–96 (2012).
336. Pavel, M. & Rubinsztein, D. C. Mammalian autophagy and the plasma membrane. *FEBS J.* **284,** 672–679 (2017).
337. Popovic, D. & Dikic, I. TBC1D5 and the AP2 complex regulate ATG9 trafficking and initiation of autophagy. *EMBO Rep.* **15,** 392–401 (2014).
338. Moreau, K., Ravikumar, B., Renna, M., Puri, C. & Rubinsztein, D. C. Autophagosome precursor maturation requires homotypic fusion. *Cell* **146,** 303–317 (2011).
339. Saitoh, T. *et al.* Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106,** 20842–6 (2009).
340. Razi, M., Chan, E. Y. W. & Tooze, S. A. Early endosomes and endosomal coatomer are required for Autophagy. *J. Cell Biol.* **185,** 305–321 (2009).

341. Filimonenko, M. *et al.* Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J. Cell Biol.* **179,** 485–500 (2007).
342. Fader, C. M., Sánchez, D. G., Mestre, M. B. & Colombo, M. I. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim. Biophys. Acta* **1793,** 1901–16 (2009).
343. Jäger, S. *et al.* Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J. Cell Sci.* **117,** 4837–48 (2004).
344. Szatmari, Z. *et al.* Rab11 facilitates cross-talk between autophagy and endosomal pathway through regulation of Hook localization. *Mol. Biol. Cell* **25,** 522–531 (2014).
345. Lee, J.-A., Beigneux, A., Ahmad, S. T., Young, S. G. & Gao, F.-B. ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr. Biol.* **17,** 1561–7 (2007).
346. Itakura, E., Kishi-Itakura, C. & Mizushima, N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* **151,** 1256–69 (2012).
347. Lai, S.-C. & Devenish, R. J. LC3-Associated Phagocytosis (LAP): Connections with Host Autophagy. *Cells* **1,** 396–408 (2012).
348. Martinez, J. *et al.* Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nat. Cell Biol.* **17,** 893–906 (2015).
349. Sanjuan, M. A. *et al.* Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* **450,** 1253–7 (2007).
350. Martinez, J. *et al.* Noncanonical autophagy inhibits the autoinflammatory, lupus-like response to dying cells. *Nature* **533,** 115–9 (2016).
351. Anding, A. L. & Baehrecke, E. H. Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles. *Dev. Cell* **41,** 10–22 (2017).
352. Heinrichs, A. Protein degradation: Ribophagy: selective ribosome 'eating'. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9,** 348–349 (2008).
353. Till, A., Lakhani, R., Burnett, S. F. & Subramani, S. Pexophagy: The Selective Degradation of Peroxisomes. *Int. J. Cell Biol.* **2012,** 1–18 (2012).
354. Wileman, T. Autophagy as a defence against intracellular pathogens. *Autophagy Mol. Mech.* **55,** 153–163 (2013).
355. Galluzzi, L. *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* e201796697 (2017). doi:10.15252/embj.201796697
356. Birgisdottir, A. B., Lamark, T. & Johansen, T. The LIR motif – crucial for selective autophagy. *J. Cell Sci.* (2013).
357. Pankiv, S. *et al.* p62 / SQSTM1 Binds Directly to Atg8 / LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates. (2007). doi:10.1074/jbc.M702824200
358. Kirkin, V. *et al.* A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol. Cell* **33,** 505–16 (2009).
359. Wild, P. *et al.* Phosphorylation of the Autophagy Receptor Optineurin Restricts Salmonella Growth. *Science (80-.).* **333,** 228–233 (2011).
360. Thurston, T. L. M., Ryzhakov, G., Bloor, S., von Muhlinen, N. & Randow, F. The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat. Immunol.* **10,** 1215–21 (2009).
361. Nagy, V. & Dikic, I. Ubiquitin ligase complexes: from substrate selectivity to conjugational specificity. *Biol. Chem.* **391,** (2010).
362. Davis, M. E. & Gack, M. U. Ubiquitination in the antiviral immune response. *Virology* **479-480,** 52–65 (2015).
363. Greene, W. *et al.* The Ubiquitin / Proteasome System Mediates Entry and Endosomal Trafficking of Kaposi ' s Sarcoma-Associated Herpesvirus in Endothelial Cells. **8,** (2012).
364. Haglund, K. & Dikic, I. The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting. *J. Cell Sci.* **125,** 265–75 (2012).
365. Kraft, C., Peter, M. & Hofmann, K. Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat. Cell Biol.* **12,** 836–841 (2010).
366. Svenning, S. & Johansen, T. Selective autophagy. *Essays Biochem.* **55,** 79–92 (2013).
367. Fujita, N. *et al.* Recruitment of the autophagic machinery to endosomes during infection is mediated by ubiquitin. *J. Cell Biol.* **203,** 115–128 (2013).
368. Paz, I. *et al.* Galectin-3, a marker for vacuole lysis by invasive pathogens. *Cell. Microbiol.* **12,** 530–44 (2010).
369. Montespan, C. *et al. Multi-layered control of Galectin-8 mediated autophagy during adenovirus cell entry through a conserved PPxY motif in the viral capsid*. *PLoS Pathogens* **13,** (2017).

370. Maier, O., Marvin, S. A., Wodrich, H., Campbell, E. M. & Wiethoff, C. M. Spatiotemporal Dynamics of Adenovirus Membrane Rupture and Endosomal Escape. *J. Virol.* **86,** 10821–10828 (2012).
371. Boyle, K. B. & Randow, F. The role of 'eat-me' signals and autophagy cargo receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* **16,** 339–348 (2013).
372. von Muhlinen, N. *et al.* LC3C, bound selectively by a noncanonical LIR motif in NDP52, is required for antibacterial autophagy. *Mol. Cell* **48,** 329–42 (2012).
373. Tumbarello, D. A. *et al.* The Autophagy Receptor TAX1BP1 and the Molecular Motor Myosin VI Are Required for Clearance of Salmonella Typhimurium by Autophagy. *PLoS Pathog.* **11,** e1005174 (2015).
374. Sanchez, J. G. *et al.* The tripartite motif coiled-coil is an elongated antiparallel hairpin dimer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111,** 2494–2499 (2014).
375. Ozato, K., Shin, D.-M., Chang, T.-H. & Morse, H. C. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **8,** 849–860 (2008).
376. Papin, S. *et al.* The SPRY domain of Pyrin, mutated in familial Mediterranean fever patients, interacts with inflammasome components and inhibits proIL-1beta processing. *Cell Death Differ.* **14,** 1457–66 (2007).
377. Ganser-Pornillos, B. K. Hexagonal assembly of a restricting TRIM5α protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108,** 534–539 (2011).
378. Singh, R. *et al.* TRIM5 and TRIM22 Are Differentially Regulated According to HIV-1 Infection Phase and Compartment. *J. Virol.* **88,** 4291–4303 (2014).
379. Kajaste-Rudnitski, A. *et al.* TRIM22 Inhibits HIV-1 Transcription Independently of Its E3 Ubiquitin Ligase Activity, Tat, and NF- B-Responsive Long Terminal Repeat Elements. *J. Virol.* **85,** 5183–5196 (2011).
380. Michae A Mandell, Ashish Jain, Suresh Kumar, Moriah J Castleman, Tahira Anwar, Eeva-Liisa Eskelinen, Terje Johansen, Rytis Prekeris, and V. D. TRIM17 contributes to autophagy of midbodies while actively sparing other targets from degradation. *J. Cell Sci.* **62,** 3562–3573 (2016).
381. Tomar, D., Singh, R., Singh, A. K., Pandya, C. D. & Singh, R. TRIM13 regulates ER stress induced autophagy and clonogenic ability of the cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1823,** 316–26 (2012).
382. Yang, Y. *et al.* Acetylated hsp70 and KAP1-mediated Vps34 SUMOylation is required for autophagosome creation in autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110,** 6841–6846 (2013).
383. Khan, M. M. *et al.* Role of autophagy, SQSTM1, SH3GLB1, and TRIM63 in the turnover of nicotinic acetylcholine receptors. *Autophagy* **10,** 123–36 (2014).
384. He, W. *et al.* Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 Interacts with and Contributes to Growth Inhibiting Effect of PML. *PLoS One* **9,** e113089 (2014).
385. Xu, Y. *et al.* Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity* **27,** 135–44 (2007).
386. Shi, C.-S. & Kehrl, J. H. MyD88 and Trif Target Beclin 1 to Trigger Autophagy in Macrophages. *J. Biol. Chem.* **283,** 33175–33182 (2008).
387. Delgado, M. A. & Deretic, V. Toll-like receptors in control of immunological autophagy. *Cell Death Differ.* **16,** 976–83 (2009).
388. Campbell, G. R. & Spector, S. A. Toll-Like Receptor 8 Ligands Activate a Vitamin D Mediated Autophagic Response that Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1. *PLoS Pathog.* **8,** (2012).
389. Delgado, M. A., Elmaoued, R. A., Davis, A. S., Kyei, G. & Deretic, V. Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J.* **27,** 1110–21 (2008).
390. Zhou, D., Kang, K. H. & Spector, S. a. Production of interferon α by human immunodeficiency virus type 1 in human plasmacytoid dendritic cells is dependent on induction of autophagy. *J. Infect. Dis.* **205,** 1258–67 (2012).
391. Blanchet, F. P. & Piguet, V. Immunoamphisomes in dendritic cells amplify TLR signaling and enhance exogenous antigen presentation on MHC-II. *Autophagy* **6,** 816–8 (2010).
392. Travassos, L. H., Carneiro, L. A. M., Girardin, S. & Philpott, D. J. Nod proteins link bacterial sensing and autophagy. *Autophagy* **6,** 409–411 (2010).
393. Ramjeet, M., Hussey, S., Philpott, D. J. & Travassos, L. H. 'Nodophagy': New cross-roads in Crohn disease pathogenesis. *Gut Microbes* **1,** (2010).
394. Jounai, N. *et al.* The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104,** 14050–5 (2007).
395. Tal, M. C. *et al.* Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106,** 2770–5 (2009).
396. El-awady, A. R. *et al.* Porphyromonas gingivalis Evasion of Autophagy and Intracellular Killing by Human Myeloid Dendritic Cells Involves DC- SIGN-TLR2 Crosstalk. 1–28 (2015). doi:10.1371/journal.ppat.1004647

397. Ma, J., Becker, C., Lowell, C. A. & Underhill, D. M. Dectin-1-triggered recruitment of light chain 3 protein to phagosomes facilitates major histocompatibility complex class II presentation of fungal-derived antigens. *J. Biol. Chem.* **287,** 34149–56 (2012).
398. Gutierrez, M. G. *et al.* Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* **119,** 753–766 (2004).
399. Nakagawa, I. *et al.* Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science* **306,** 1037–40 (2004).
400. Deretic, V. *et al.* Mycobacterium tuberculosis inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. *Cell. Microbiol.* **8,** 719–27 (2006).
401. Mauthe, M. *et al.* WIPI-1 positive autophagosome-like vesicles entrap pathogenic staphylococcus aureus for lysosomal degradation. *Int. J. Cell Biol.* **2012,** (2012).
402. Lapaquette, P., Glasser, A.-L., Huett, A., Xavier, R. J. & Darfeuille-Michaud, A. Crohn's disease-associated adherent-invasive E. coli are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell. Microbiol.* **12,** 99–113 (2010).
403. Zheng, Y. T. *et al.* The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *J. Immunol.* **183,** 5909–5916 (2009).
404. Mostowy, S. *et al.* Entrapment of intracytosolic bacteria by septin cage-like structures. *Cell Host Microbe* **8,** 433–44 (2010).
405. Ogawa, M. *et al.* A Tecpr1-dependent selective autophagy pathway targets bacterial pathogens. *Cell Host Microbe* **9,** 376–89 (2011).
406. Gutierrez, M. G. *et al.* Autophagy induction favours the generation and maturation of the Coxiella-replicative vacuoles. *Cell. Microbiol.* **7,** 981–93 (2005).
407. Romano, P. S., Gutierrez, M. G., Berón, W., Rabinovitch, M. & Colombo, M. I. The autophagic pathway is actively modulated by phase II Coxiella burnetii to efficiently replicate in the host cell. *Cell. Microbiol.* **9,** 891–909 (2007).
408. Mansilla Pareja, M. E., Bongiovanni, A., Lafont, F. & Colombo, M. I. Alterations of the Coxiella burnetii Replicative Vacuole Membrane Integrity and Interplay with the Autophagy Pathway. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7,** (2017).
409. Orvedahl, A. & Levine, B. Viral evasion of autophagy. *Autophagy* **4,** 280–285 (2008).
410. Orvedahl, A. *et al.* Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell Host Microbe* **7,** 115–27 (2010).
411. Joubert, P.-E. *et al.* Chikungunya virus-induced autophagy delays caspase-dependent cell death. *J. Exp. Med.* **209,** 1029–47 (2012).
412. Judith, D. *et al.* Species-specific impact of the autophagy machinery on Chikungunya virus infection. *EMBO Rep.* **14,** 534–544 (2013).
413. Metz, P. *et al.* Dengue Virus Inhibition of Autophagic Flux and Dependency of Viral Replication on Proteasomal Degradation of the Autophagy Receptor p62. *J. Virol.* **89,** 8026–41 (2015).
414. Joubert, P.-E. *et al.* Autophagy Induction by the Pathogen Receptor CD46. *Cell Host Microbe* **6,** 354–366 (2009).
415. Grégoire, I. P. *et al.* IRGM is a common target of RNA viruses that subvert the autophagy network. *PLoS Pathog.* **7,** (2011).
416. Lussignol, M. *et al.* The herpes simplex virus 1 Us11 protein inhibits autophagy through its interaction with the protein kinase PKR. *J. Virol.* **87,** 859–71 (2013).
417. Lennemann, N. J. & Coyne, C. B. Catch Me If You Can: The Link between Autophagy and Viruses. *PLoS Pathog.* **11,** 1–6 (2015).
418. Sir, D. *et al.* Replication of Hepatitis C Virus RNA on Autophagosomal Membranes. *J. Biol. Chem.* **287,** 18036–18043 (2012).
419. Robinson, S. M. *et al.* Coxsackievirus B Exits the Host Cell in Shed Microvesicles Displaying Autophagosomal Markers. *PLoS Pathog.* **10,** e1004045 (2014).
420. Gannagé, M. *et al.* Matrix Protein 2 of Influenza A Virus Blocks Autophagosome Fusion with Lysosomes. *Cell Host Microbe* **6,** 367–380 (2009).
421. Denizot, M. *et al.* HIV-1 gp41 fusogenic function triggers autophagy in uninfected cells. *Autophagy* **4,** 998–1008 (2008).
422. Espert, L. *et al.* Differential role of autophagy in CD4 T cells and macrophages during X4 and R5 HIV-1 infection. *PLoS One* **4,** (2009).
423. Zhou, D. & Spector, S. A. Human immunodeficiency virus type-1 infection inhibits autophagy. *AIDS* **22,** 695–699 (2008).
424. Borel, S. *et al.* HIV-1 viral infectivity factor interacts with light chain 3 and inhibits autophagy. *AIDS* 275–

286 (2015). doi:10.1097/QAD.0000000000000554
425. Sagnier, S. *et al.* Autophagy restricts HIV-1 infection by selectively degrading Tat in CD4+ T lymphocytes. *J. Virol.* **89,** 615–25 (2015).
426. Mandell, M. A., Kimura, T., Jain, A., Johansen, T. & Deretic, V. TRIM proteins regulate autophagy: TRIM5 is a selective autophagy receptor mediating HIV-1 restriction. *Autophagy* **10,** 2387–2388 (2014).
427. Kyei, G. B. *et al.* Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J. Cell Biol.* **186,** 255–268 (2009).
428. Van Grol, J. *et al.* HIV-1 Inhibits Autophagy in Bystander Macrophage/Monocytic Cells through Src-Akt and STAT3. *PLoS One* **5,** e11733 (2010).
429. Chauhan, S., Mandell, M. A. & Deretic, V. IRGM governs the core autophagy machinery to conduct antimicrobial defense. *Mol. Cell* **58,** 507–21 (2015).
430. Campbell, G. R. & Spector, S. A. Vitamin D Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Mycobacterium tuberculosis Infection in Macrophages through the Induction of Autophagy. **8,** (2012).
431. Liu, Y., Tai, A., Joo, K. Il & Wang, P. Visualization of DC-SIGN-Mediated Entry Pathway of Engineered Lentiviral Vectors in Target Cells. *PLoS One* **8,** 1–10 (2013).
432. Kimura, T., Mandell, M. & Deretic, V. Precision autophagy directed by receptor regulators - emerging examples within the TRIM family. *J. Cell Sci.* **129,** 881–891 (2016).
433. Jameson, B. *et al.* Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques. *J. Virol.* **76,** 1866–75 (2002).
434. Curtis, B. M., Scharnowske, S. & Watson, A. J. Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89,** 8356–60 (1992).
435. Lozach, P. Y. *et al.* C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J. Biol. Chem.* **279,** 32035–32045 (2004).
436. Maeda, N. *et al.* The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between Mycobacterium species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *J. Biol. Chem.* **278,** 5513–5516 (2003).
437. Lang, S. M., Bynoe, M. O. F., Karki, R., Tartell, M. A. & Means, R. E. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus K3 and K5 Proteins Down Regulate Both DC-SIGN and DC-SIGNR. *PLoS One* **8,** (2013).
438. Bonifacino, J. S. & Traub, L. M. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* **72,** 395–447 (2003).
439. Turville, S. G. *et al.* Bitter-sweet symphony: Defining the role of dendritic cell gp120 receptors in HIV infection. *J. Clin. Virol.* **22,** 229–239 (2001).
440. Vergne, I., Gilleron, M. & Nigou, J. Manipulation of the endocytic pathway and phagocyte functions by Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4,** 187 (2014).
441. Ravikumar, B., Moreau, K. & Rubinsztein, D. C. Plasma membrane helps autophagosomes grow. *Autophagy* **6,** 1184–1186 (2010).
442. Nair, U. *et al.* SNARE proteins are required for macroautophagy. *Cell* **146,** 290–302 (2011).
443. Moreau, K. La biogenèse des autophagosomes perd de son mystère. *Medecine/Sciences* **27,** 1075–1077 (2011).
444. Levine, B. & Kroemer, G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* **132,** 27–42 (2008).
445. Cuervo, A. M. The plasma membrane brings autophagosomes to life. *Nat. Cell Biol.* **12,** 735–737 (2010).
446. Moreau, K. & Rubinsztein, D. C. The plasma membrane as a control center for autophagy. *Autophagy* **8,** 861–863 (2012).
447. Polson, H. E. J. *et al.* Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* **6,** 506–522 (2010).
448. Feng, Y. *et al.* Phosphorylation of Atg9 regulates movement to the phagophore assembly site and the rate of autophagosome formation. *Autophagy* **12,** 648–658 (2016).
449. Kimura, T. *et al.* TRIM-Directed Selective Autophagy Regulates Immune Activation. *Autophagy* **13,** 00–00 (2016).
450. Alemu, E. A. *et al.* ATG8 family proteins act as scaffolds for assembly of the ULK complex: sequence requirements for LC3-interacting region (LIR) motifs. *J. Biol. Chem.* **287,** 39275–90 (2012).
451. Kalvari, I. *et al.* iLIR: A web resource for prediction of Atg8-family interacting proteins. *Autophagy* **10,** 913–25 (2014).
452. Tomar, D., Singh, R., Singh, A. K., Pandya, C. D. & Singh, R. TRIM13 regulates ER stress induced autophagy and clonogenic ability of the cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1823,** 316–326 (2012).
453. Pankiv, S. *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* **282,** 24131–45 (2007).

454. van den Berg, L. M., Gringhuis, S. I. & Geijtenbeek, T. B. H. An evolutionary perspective on C-type lectins in infection and immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1253,** 149–158 (2012).
455. Shoji-Kawata, S. Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. *Seikagaku.* **87,** 481–484 (2015).

ANNEXES

Chapitre de livre : **Papin L**., Daussy C., Alfaisal J., Espert L., Blanchet F., Blanco J., Biard-Piechaczyk M., Autophagy and HIV Infection, *Encyclopedia of AIDS*, 2015

Encyclopedia of AIDS
DOI 10.1007/978-1-4614-9610-6_395-1
© Springer Science+Business Media New York 2015

Autophagy and HIV Infection

Laure Papin[a,$], Coralie F. Daussy[a,$], Jamal Alfaisal[a,$], Lucile Espert[a], Fabien P. Blanchet[a], Julià Blanco[b,c] and Martine Biard-Piechaczyk[a]*
[a]Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé (CPBS), CNRS–UMR, Montpellier, France
[b]Fundacio irsiCaixa, Institut de Recerca Germans Trias I Pujol (IGTP), Barcelona, Spain
[c]Universitat de Vic (UVIC-UCC), Vic, Spain

Definition

Autophagy is a fundamental and highly regulated lysosomal degradation mechanism, dependent on specialized autophagy-related proteins (Atgs) (Mizushima et al. 2011). It can be classified into macroautophagy, microautophagy, and chaperone-mediated autophagy, but only macroautophagy will be described and hereafter referred to as autophagy since it is the major lysosomal route for the turnover of cytoplasmic constituents. It is characterized by the formation of membranes that engulf cytoplasmic material through the formation of autophagic vacuoles, called autophagosomes. These structures fuse with lysosomes to form autolysosomes where the sequestered material is digested by lysosomal hydrolases. Before this degradative step, autophagosomes can also fuse with endosomes to form amphisomes, making a direct connection between the endo-lysosomal and autophagic pathways. This process is highly dynamic, and constituents are continuously recycled through lysosomal transporters toward the cytosol. Autophagy plays essential physiological roles in survival, homeostasis, and development and is closely linked to several mechanisms of cell death such as apoptosis, pyroptosis, and necroptosis. It is also involved in the defense against invading intracellular pathogens and acts in both innate and adaptive immunities.

Introduction

Autophagy has an essential role in cell homeostasis and has been implicated in several pathologies including cancer, neurodegeneration, and myopathies. It is a constitutive mechanism further induced by different stresses or stimuli that are dangerous for the cell. For example, autophagy is essential to provide energy and amino acids during starvation. It also prevents cell death or senescence due to accumulation of defective organelles, in particular damaged mitochondria, and large macromolecular aggregates.

The global autophagy process is presented in Fig. 1.

It requires several specific protein complexes regulating different steps of the autophagy flux (for review (Ravikumar et al. 2010)).

The ULK1/ULK2 complex is involved in the initiation step of autophagy. The function of this multiprotein complex, composed of ULK1/ULK2, Atg13, Atg101, and FIP200, is tightly controlled by the mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 1 (MTORC1), which represses autophagy flux initiation under nutrient-rich conditions.

The second complex is composed of class III phosphatidylinositol 3-kinase (PI3KC3), Beclin 1, p150, and Atg14L, which produces an autophagy-specific pool of phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P).

[$] *Author contributed equally with all other contributors*
*Email: Martine.biard@cpbs.cnrs.fr

Encyclopedia of AIDS
DOI 10.1007/978-1-4614-9610-6_395-1
© Springer Science+Business Media New York 2015

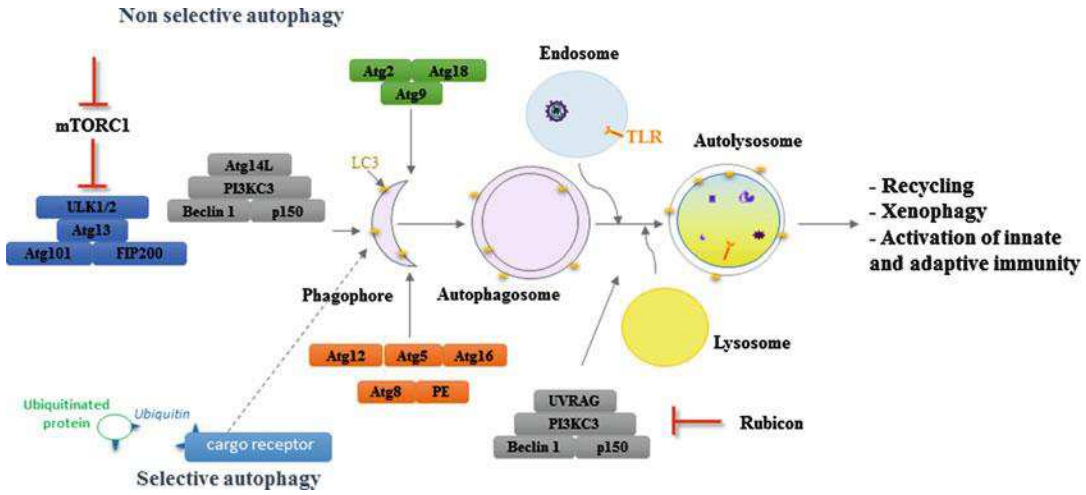


Fig. 1 Autophagy pathway

Several additional proteins interacting with Beclin 1 ensure a timely and spatial regulation of PI3P formation during the autophagy process.

Then, two unique ubiquitin (Ub)-like conjugation systems drive the elongation and closure of the autophagic membrane. In the first conjugation system, Atg12 is conjugated to Atg5, in a reaction mediated by the Ub-activating enzyme (E1)-like Atg7 and the Ub-conjugating enzyme (E2)-like Atg10. No specific and exclusive Ub ligase (E3)-like has been discovered so far. Atg16L1 interacts with the Atg12–Atg5 conjugate to form a scaffold necessary for LC3 lipidation. The second conjugation system leads to the conjugation of proteins of the Atg8 family to the lipid phosphatidylethanolamine (PE) through a mechanism controlled by Atg7 and Atg3, another E2-like enzyme. The Atg12–Atg5 conjugate is an E3-like for the Atg8–PE conjugation reaction. In humans, the Atg8 family comprises three microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3A, LC3B, and LC3C), one gamma-aminobutyrate receptor-associated protein (GABARAP), and three GABARAP-like proteins (GABARAPL1–3). However, only LC3B has been extensively studied and will be hereafter referred to as LC3. LC3 is synthesized as pro-LC3 and is very rapidly processed by the protease Atg4 to expose its C-terminal glycine. During autophagosome formation, a fraction of this cytosolic, soluble form of LC3, also called LC3-I, can be conjugated to PE to generate the lipid-conjugated form of LC3, or LC3-II, which becomes tightly associated with the autophagosomal membrane while the Atg5–Atg12 conjugate is removed from the neo-formed vesicles. Interestingly, LC3-II can also return to an unlipidated state via the proteolytic activity of Atg4, indicating, therefore, that this process could be reversible, although its functionality is not yet understood.

In turn, Beclin 1 recruits several proteins such as UVRAG and PI3KC3 to form a complex that plays a major role in the maturation step of autophagy. This complex is negatively controlled by the RUN domain-containing protein Rubicon. It is worth noting that Beclin 1 interacts with the antiapoptotic protein Bcl2, as well as Bcl-XL, Bcl-w, and Mcl-1. Beclin 1 binding to Bcl2 represses autophagy when Bcl2 is localized in the endoplasmic reticulum. Upon stress, Beclin 1 dissociates from Bcl-2, allowing the activation of PI3KC3 and the subsequent stimulation of autophagy. This is one of the multiple links that exist between autophagy and apoptosis. Although not yet fully investigated, other cross talks also exist between autophagy and other programmed cell death pathways (necroptosis, pyroptosis) and the Ub–proteasome system, the other main degradative pathway.

DOI 10.1007/978-1-4614-9610-6_395-1
© Springer Science+Business Media New York 2015

Autophagy was first described as a nonselective bulk degradation pathway. However, specific forms of autophagy can also selectively degrade cytoplasmic components such as organelles (e.g., mitochondria, peroxisomes, lipid droplets, ribosomes) and proteins that can also be under aggregate forms.

This function is supported by cargo receptors (e.g., p62/SQSTM1, NBR1, and NDP52), which bind to both "eat-me" signals, mainly molecules of Ub, and Atg8 family members present on the autophagosomal membrane. Binding to Atg8 family engages a specific motif, called an LC3-interacting region (LIR), with the general sequence W/F/YxxI/L/V preceded by acidic residues.

There is now a growing line of evidence that autophagy is also an essential pathway for host defense against viral infection. Autophagy acts at different stages of antiviral immunity, including the degradation of entire viruses or specific viral proteins by a process termed xenophagy, the activation of innate immune signaling by delivery of viral nucleic acids to endosomal Toll-like receptors (TLRs), and the activation of adaptive immunity by presentation of viral antigens to major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules. As a consequence, the viruses have evolved strategies to counteract or to exploit autophagy for their own profit.

HIV-1, as many other viruses, manipulates autophagy for its own replication. Its regulation depends on the cell type ($CD4^+$ T cells, macrophages, or dendritic cells) and the status of the cells (i.e., infected or uninfected cells). This process is also at the center of the innate and adaptive immune responses against HIV-1.

Autophagy is mainly an anti-HIV mechanism, although several Atgs, including Atg7, Atg12, Atg16L, and GABARAPL2, are seemingly required for HIV-1 infection, as demonstrated through a functional genomic screen using HeLa-derived TZM-bl cells (Brass et al. 2008). Several Atgs, in particular Atg5 and Atg16, are also needed for HIV-1 replication in $CD4^+$ T cells (Eekels et al. 2012), suggesting that either HIV-1 needs the initiation step of autophagy or at least some of its components. It is worth noting that autophagy-related proteins can also function independently of the autophagic process, and this aspect has to be taken into consideration when trying to decipher the link between autophagy, autophagic proteins, and HIV-1 infection.

Strikingly, autophagy is also responsible for the apoptosis of bystander $CD4^+$ T cells triggered by HIV-1 envelope.

Autophagy in $CD4^+$ T Cells During HIV-1 Infection

$CD4^+$ T lymphocytes represent the main target cell population for HIV-1 infection, and their progressive destruction is the hallmark of AIDS (Barré-Sinoussi et al. 1983). Depletion of this cell population is mainly due to apoptosis of bystander uninfected $CD4^+$ T cells ("► Lymphocyte Apoptosis" and Finkel et al. (1995)) for which the viral envelope, composed of gp120 and gp41, plays an important role since it constitutes the primary interface between viruses and target cells. In particular, the gp41-mediated fusion process occurring during HIV-1 entry triggers activation of the intrinsic pathway of apoptosis, with activation of the caspases 9 and 3 (Roggero et al. 2001; Blanco et al. 2003; Garg and Blumenthal 2008). Recently, abortive HIV-1 infection, occurring in the vast majority of bystander quiescent $CD4^+$ T cells, was shown to be responsible for an inflammatory form of cell death, called pyroptosis ("► Pyroptosis and HIV Replication"), characterized by the activation of caspase 1 and the release of inflammatory cytokines upon viral DNA sensing by the interferon-γ-inducible protein 16 (IFI16) (Doitsh et al. 2014; Monroe et al. 2014).

Importantly, autophagy is also activated in bystander $CD4^+$ T cells after their contact with infected cells, through the gp41-dependent fusion of both membranes, and leads to their apoptosis (Espert et al. 2006; Denizot et al. 2008). Autophagy contributes, therefore, to the depletion of $CD4^+$ T cells during HIV-1 infection.

DOI 10.1007/978-1-4614-9610-6_395-1
© Springer Science+Business Media New York 2015

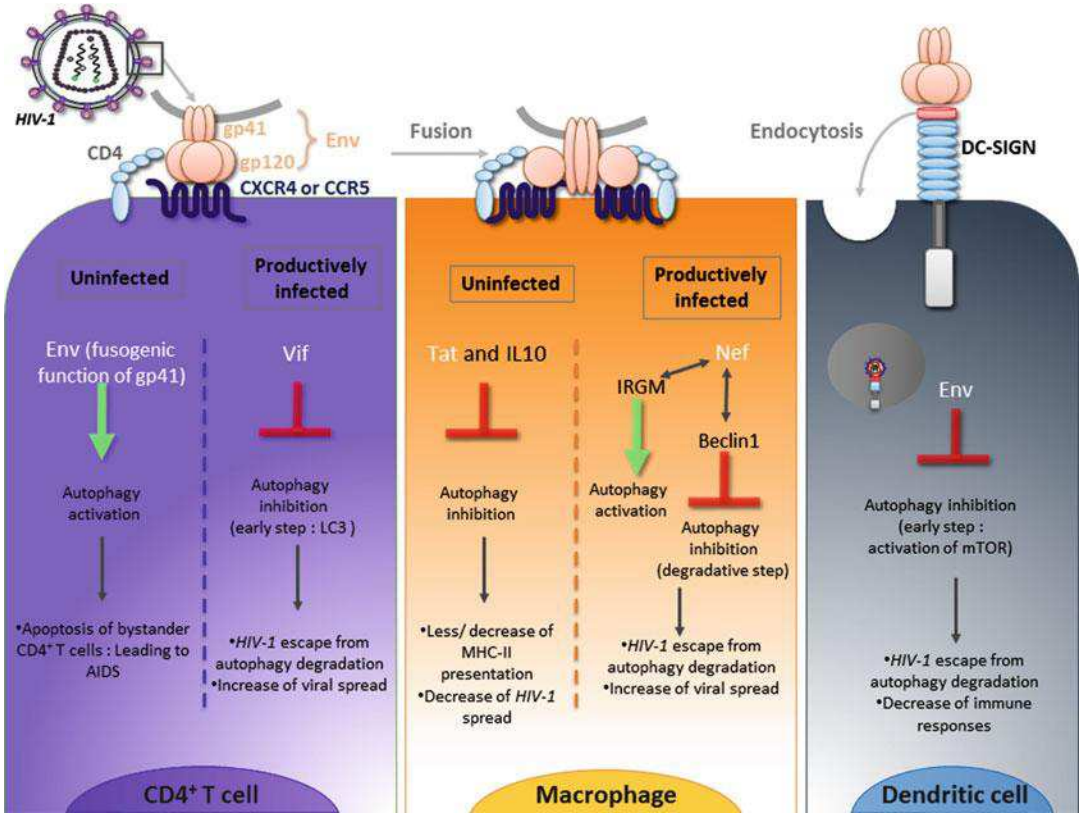


Fig. 2 Relationship between autophagy and HIV-1 infection of its main target cells, namely, $CD4^+$ T cells, macrophages, and dendritic cells

Autophagy is an anti-HIV-1 process by specifically degrading Tat, a viral protein essential for viral replication (Sagnier et al. 2015). As a consequence, autophagy is repressed in productively infected cells. Very recent data indicate that autophagy in $CD4^+$ T cells could be indeed targeted by the viral protein Vif upon specific binding to the autophagy-related protein LC3 (Borel et al. 2015) (Fig. 2, left part).

Autophagy in Macrophages During HIV-1 Infection

In contrast to $CD4^+$ T cells, bystander macrophages do not undergo autophagy after contact with HIV-1 envelope (Espert et al. 2009). This blockade is dependent on the activation of Src–Akt and Stat 3 by HIV-1 Tat and IL-10, both previously reported to inhibit autophagy (Van Grol et al. 2010). HIV-1 Tat was also shown to suppress IFN-γ-induced autophagy in primary macrophages (Li et al. 2011), suggesting that inhibition of autophagy could negatively impact on innate immune defenses of myeloid cells devoted in the killing of intracellular pathogens. Overall, this result correlated well with the physiopathology reported from HIV-1-infected patients. Indeed, macrophages do not undergo Env-mediated apoptosis and are seemingly not subjected to depletion during HIV-1 infection, at least compared to the level of $CD4^+$ T cell depletion. These observations raise many relevant but still unsolved questions, including why the fusogenic function of gp41 induces autophagy only in $CD4^+$ T cells and why Tat and IL-10 would not inhibit autophagy in bystander $CD4^+$ T cells.

Conversely, in cells from the monocyte/macrophage lineage, autophagy is induced following a productive infection (Espert et al. 2009) and acts as an antiviral mechanism (Espert et al. 2009; Kyei et al. 2009). Surprisingly, two populations of autophagic cells are present, one highly autophagic and the

DOI 10.1007/978-1-4614-9610-6_395-1
© Springer Science+Business Media New York 2015

other weakly autophagic, and viruses could be detected in the weakly autophagic cells but not in the highly autophagic cells, suggesting that autophagy might still be controlled by HIV-1 in these cells to avoid degradation (Espert et al. 2009). Indeed, Nef regulates autophagy in these cells by two ways. First, Nef binds to the immunity-associated GTPase family M (IRGM), inducing autophagy (Gregoire et al. 2011), and second, Nef binds to Beclin 1, blocking the degradative step of autophagy (Kyei et al. 2009).

The dual interaction of HIV-1 with autophagy thus enhances viral yields by using the early stages while inhibiting the late stages of autophagy (Fig. 2, central part).

Apart from Nef, the antisense protein ASP, produced from antisense transcription of the HIV-1 genome, partially co-localizes with LC3. Preliminary data suggest that expression of ASP induces autophagy and increases viral replication in the promonocytic U937 cell line (Torresilla et al. 2013).

Autophagy in Dendritic Cells During HIV-1 Infection

Although some dendritic cell (DC) subsets could differ in phenotype and functions, one of their hallmarks is their propensity to regulate innate and adaptive immunity.

DC (DCs) are known to regulate innate and adaptive immunity, and most of the subsets express a plethora of pathogen recognition receptors (PRR) ("▶ Pathogen Recognition Receptors (General)") facilitating their antigen sampling activity and contributing to their quickness in efficiently igniting adapted immune responses. Some DC subsets were also reported to be involved in the early events of HIV transmission. Even if they are mostly refractory to productive HIV infection, these cells can readily internalize virions via different receptors expressed at the surface, like C-type (CD209/DC-SIGN) or I-type (CD169/SIGLEC-1) lectins, and transmit them toward $CD4^+$ T cells.

Upon viral challenge, autophagy is rapidly inhibited in DCs through the activation of mTOR by HIV-1 envelope. This autophagy blockade impairs Toll-like receptor-mediated innate immune response while also strongly affecting antigen processing and MHC-II-mediated antigen presentation to $CD4^+$ T cells (Blanchet et al. 2010) (Fig. 2, right part) potentially limiting anti-HIV immune responses.

Conclusion

Taken together, these results suggest a complex, cell-type-specific relationship between HIV-1 and the autophagic response and highlight the complexity of HIV-1 pathogenesis. Autophagy appears to play different roles in controlling HIV-1 replication, depending on the cell type. In turn, HIV-1 has evolved individualized strategies to manipulate autophagy in each cell type. Whatever the cells involved, autophagy is unambiguously involved in HIV-1 pathogenesis, and more investigation on its antiviral role should strengthen our understanding of the interplay between the virus and the host.

Further studies are needed to (i) decipher the mechanisms that are activated after gp41-dependent membrane fusion during the entry of the virus leading to autophagy, (ii) understand the link between autophagy and apoptosis or other cell death mechanisms in the bystander $CD4^+$ T cells, (iii) determine the viral proteins responsible for the control of autophagy in the infected cells, and (iv) understand the connections between autophagy and viral trafficking through endocytic compartments linked to immune responses in DC.

DOI 10.1007/978-1-4614-9610-6_395-1
© Springer Science+Business Media New York 2015

Modulation of the autophagy flux might thus be a promising approach to improve immunomodulatory approaches to treat HIV-1 infection aimed to increase immune responses in complementation to HAART.

Acknowledgment

Laure Papin doctoral fellowship is funded by Sidaction, and Jamal Alfaisal is profiting from the DUNIA BEAM Erasmus Mundus scholarship, funded with the support of the European Commission.

Cross-References

► Lymphocyte Apoptosis
► Pathogen Recognition Receptors (General)
► Pyroptosis and HIV Replication

References

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauget C, Axler-Blin C, Brun-Vezinet F, Rouzioux C, Rozembaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Science. 1983;220:868–70.

Blanchet FP, Moris A, Nikolic DS, Lehmann M, Cardinaud S, Stalder R, Garcia E, Dinkins C, Leuba F, Wu L, Schwartz O, Deretic V, Piguet V. Human immunodeficiency virus-1 inhibition of immunoamphisomes in dendritic cells impairs early innate and adaptive immune responses. Immunity. 2010;32:654–69.

Blanco J, Barretina J, Ferri KF, Jacotot E, Gutierrez A, Armand-Ugon M, Cabrera C, Kroemer G, Clotet B, Este JA. Cell-surface-expressed HIV-1 envelope induces the death of CD4 T cells during GP41-mediated hemifusion-like events. Virology. 2003;305:318–29.

Borel S, Robert-Hebmann V, Alfaisal J, Jain A, Faure M, Espert L, Chaloin L, Paillart JC, Johansen T, Biard-Piechaczyk M. HIV-1 Vif interacts with microtubule-associated protein light chain 3 and inhibits autophagy. AIDS 2015. In press.

Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, Yan N, Engelman A, Xavier RJ, Lieberman J, Elledge SJ. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. Science. 2008;319:921–6.

Denizot M, Varbanov M, Espert L, Robert-Hebmann V, Sagnier S, Garcia E, Curriu M, Mamoun R, Blanco J, Biard-Piechaczyk M. HIV-1 gp41 fusogenic function triggers autophagy in uninfected cells. Autophagy. 2008;4:998–1008.

Doitsh G, Galloway NL, Geng X, Yang Z, Monroe KM, Zepeda O, Hunt PW, Hatano H, Sowinski S, Munoz-Arias I, Greene WC. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. Nature. 2014;505:509–14.

Eekels JJ, Sagnier S, Geerts D, Jeeninga RE, Biard-Piechaczyk M, Berkhout B. Inhibition of HIV-1 replication with stable RNAi-mediated knockdown of autophagy factors. Virol J. 2012;9:69.

Espert L, Denizot M, Grimaldi M, Robert-Hebmann V, Gay B, Varbanov M, Codogno P, Biard-Piechaczyk M. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. J Clin Invest. 2006;116:2161–72.

DOI 10.1007/978-1-4614-9610-6_395-1
© Springer Science+Business Media New York 2015

Espert L, Varbanov M, Robert-Hebmann V, Sagnier S, Robbins I, Sanchez F, Lafont V, Biard-Piechaczyk M. Differential role of autophagy in CD4 T cells and macrophages during X4 and R5 HIV-1 infection. PLoS One. 2009;4:e5787.

Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, Cotton MF, Curiel T, Monks C, Baba TW, Ruprecht RM, Kupfer A. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. Nat Med. 1995;1:129–34.

Garg H, Blumenthal R. Role of HIV Gp41 mediated fusion/hemifusion in bystander apoptosis. Cell Mol Life Sci. 2008;65:3134–44.

Gregoire IP, Richetta C, Meyniel-Schicklin L, Borel S, Pradezynski F, Diaz O, Deloire A, Azocar O, Baguet J, Le Breton M, Mangeot PE, Navratil V, Joubert PE, Flacher M, Vidalain PO, Andre P, Lotteau V, Biard-Piechaczyk M, Rabourdin-Combe C, Faure M. IRGM is a common target of RNA viruses that subvert the autophagy network. PLoS Pathog. 2011;7:e1002422.

Kyei GB, Dinkins C, Davis AS, Roberts E, Singh SB, Dong C, Wu L, Kominami E, Ueno T, Yamamoto A, Federico M, Panganiban A, Vergne I, Deretic V. Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. J Cell Biol. 2009;186:255–68.

Li JC, Au KY, Fang JW, Yim HC, Chow KH, Ho PL, Lau AS. HIV-1 trans-activator protein dysregulates IFN-gamma signaling and contributes to the suppression of autophagy induction. AIDS. 2011;25:15–25.

Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. Annu Rev Cell Dev Biol. 2011;27:107–32.

Monroe KM, Yang Z, Johnson JR, Geng X, Doitsh G, Krogan NJ, Greene WC. IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV. Science. 2014;343:428–32.

Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi FH, Underwood BR, Winslow AR, Rubinsztein DC. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. Physiol Rev. 2010;90:1383–435.

Roggero R, Robert-Hebmann V, Harrington S, Roland J, Vergne L, Jaleco S, Devaux C, Biard-Piechaczyk M. Binding of human immunodeficiency virus type 1 gp120 to CXCR4 induces mitochondrial transmembrane depolarization and cytochrome c-mediated apoptosis independently of Fas signaling. J Virol. 2001;75:7637–50.

Sagnier S, Daussy CF, Borel S, Robert-Hebmann V, Faure M, Blanchet FP, Beaumelle B, Biard-Piechaczyk M, Espert L. Autophagy restricts HIV-1 infection by selectively degrading Tat in CD4+ T lymphocytes. J Virol. 2015;89:615–25.

Torresilla C, Larocque E, Landry S, Halin M, Coulombe Y, Masson JY, Mesnard JM, Barbeau B. Detection of the HIV-1 minus-strand-encoded antisense protein and its association with autophagy. J Virol. 2013;87:5089–105.

Van Grol J, Subauste C, Andrade RM, Fujinaga K, Nelson J, Subauste CS. HIV-1 inhibits autophagy in bystander macrophage/monocytic cells through Src-Akt and STAT3. PLoS One. 2010;5:e11733.

Résumé de la thèse en français :

Les cellules dendritiques (DC) sont des sentinelles du système immunitaire résidant dans la peau et la muqueuse et sont donc parmi les premières cellules à rencontrer le virus de l'immunodéficience humaine type 1 (VIH-1). Au cours de l'infection, le VIH-1 semble avoir développé des stratégies pour éviter sa dégradation tout en réduisant les réponses immunitaires de l'hôte et en favorisant sa transmission vers les lymphocytes T CD4 + qui sont les principales cellules cibles. L'autophagie représente l'une des voies cellulaires impliquées dans le ciblage du VIH-1 vers la dégradation lysosomale dès l'entrée virale dans la DC. Dans ma thèse, je démontre que le récepteur du VIH-1, DC-SIGN, est un régulateur important de l'induction de la voie autophagique, renforcé par l'association claire entre le récepteur du VIH et certaines protéines Atg, comme Atg9, lors de l'engagement du récepteur. Une approche analytique par spectrométrie de masse a permis d'identifier de nouveaux facteurs cellulaires associés à DC-SIGN éventuellement impliqués dans la fonction immunitaire innée de ce récepteur. Parmi ces interactions, nous avons découvert la protéine TRIM25 précédemment répertoriée pour réguler l'activité antivirale RIG-I. Il est intéressant de noter que l'autophagie de précision récemment décrite, implique certains membres de la famille TRIM suggérant que notre découverte pourrait révéler une sélectivité inattendue dans la dégradation lysosomale médiée par l'autophagie des virions infectieux entrants. À l'appui de cela, nous montrons la formation d'un complexe DC-SIGN-ATG9-TRIM25-LC3 qui pourrait représenter l'étape d'initiation conduisant à une virophagie sélective anti-VIH-1 dans les DC et régulant les réponses immunitaires subséquentes. Cette virophagie sélective dépendante du récepteur DC-SIGN pourrait représenter une cible privilégiée pour améliorer certaines stratégies thérapeutiques actuelles visant à aborder les premiers événements de l'infection à VIH-1.

Mots-clés : VIH-1, Cellule dendritique, Autophagie, Immunité, Endocytose, DC-SIGN.

Résumé de la thèse en anglais :

Dendritic cells (DC) are sentinels of the immune system residing in mucosal surfaces and skin and are, therefore, among the first cells to encounter Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1). During infection, HIV-1 seems to have developed strategies to avoid its degradation while reducing host immune responses and promoting its transmission toward $CD4^+$ T cells which represent the main target cells. Autophagy represents one of the cellular pathways involved in targeting HIV-1 toward lysosomal-mediated degradation early on upon viral entry into DC. In my PhD, we demonstrate that the HIV-1 receptor DC-SIGN is an important regulator of the autophagy pathway induction, further strengthened by the clear association between the HIV-1 receptor and some Atg proteins, like Atg9, upon receptor engagement. An analytical mass spectrometry approach allowed to identify new DC-SIGN-associated cellular factors possibly involved in the innate immune function of this receptor. Among those interactants, we uncovered the protein TRIM25 previously reported to regulate RIG-I antiviral activity. Interestingly, the recently described "precision autophagy" features some TRIM family members suggesting that our discovery could reveal an unexpected selectivity in autophagy-mediated lysosomal degradation of incoming infectious virions. In support of this, we then clearly established the formation of a DC-SIGN-ATG9-TRIM25-LC3 complex which could represent the initiation step leading to a selective anti-HIV-1 virophagy in DC and regulating the subsequent immune responses. This selective DC-SIGN-dependent virophagy may represent a privileged target to improve some current therapeutic strategies aimed at tackling early events of HIV-1 infection.

Keywords : HIV-1, Dendritic Cell, Autophahy, Immunity, Endocytosis, DC-SIGN.