



**HAL**  
open science

# Caractérisation de l'activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes par les virus HTLV-1 et HTLV-2 et de son importance dans la symptomatologie viro-induite

Nicolas Futsch

## ► To cite this version:

Nicolas Futsch. Caractérisation de l'activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes par les virus HTLV-1 et HTLV-2 et de son importance dans la symptomatologie viro-induite. Immunologie. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSEN067 . tel-02124859v1

**HAL Id: tel-02124859**

**<https://theses.hal.science/tel-02124859v1>**

Submitted on 10 May 2019 (v1), last revised 29 May 2019 (v2)

**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.



Numéro National de Thèse : **2018LYSEN067**

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée par  
**l'Ecole Normale Supérieure de Lyon**

**Ecole Doctorale N° 340**  
**Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire**

**Spécialité de doctorat** : Virologie  
**Discipline** : Biologie

Soutenue publiquement le 09/11/2018, par :  
**Nicolas FUTSCH**

---

**Caractérisation de l'activation des cellules  
dendritiques plasmacytoïdes par les virus  
HTLV-1 et HTLV-2 et de son importance  
dans la symptomatologie viro-induite**

---

Devant le jury composé de :

**Claudine PIQUE**

**Ivan HIRSCH**

**Nathalie BENDRISS-VERMARE**

**Philippe AFONSO**

**Thierry WALZER**

**Hélène DUTARTRE**

Directrice de recherche au CNRS

Directeur de recherche à l'Inserm

Chargée de recherche à l'Inserm

Chargé de recherche au CNRS

Directeur de recherche à l'Inserm

Chargée de recherche à l'Inserm

Rapporteuse

Rapporteur

Examinatrice

Examinateur

Examinateur

Directrice de thèse

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les Dr. Claudine Pique et Ivan Hirsch qui ont accepté d'évaluer mon manuscrit de thèse, mais également les Dr. Nathalie Bendriss-Vermare, Philippe Afonso et Thierry Walzer d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je remercie également le Dr. Jenny Valladeau-Guilemond et le Pr. Olivier Schwartz d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse et de leur implication dans cette fonction.

Je remercie la fondation « La Ligue contre le Cancer » qui a accepté de financer mon doctorat. Je remercie le Pr. Renaud Mahieux de m'avoir accueilli au sein de son équipe et d'avoir pris le temps de participer à la progression de mes travaux. Je tiens ensuite à remercier le Dr. Hélène Dutartre pour l'encadrement scientifique de ces trois années de thèse. Merci de m'avoir fait confiance pour mener ce projet de recherche, d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions et d'apporter des corrections à mes présentations orales et mes travaux écrits, de m'avoir accordé de l'autonomie ou encore de me permettre de présenter mes travaux et de collaborer avec d'autres équipes. Tout ceci m'a permis de sentir une amélioration de ma maturité scientifique au cours de ces trois dernières années.

Je souhaite également remercier certaines personnes avec qui j'ai directement collaboré, à savoir les Dr. Sonia Assil et Marlène Dreux dans le cadre du projet sur l'identification du mécanisme d'activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes par HTLV-1 et HTLV-2, mais également le Pr. Jorge Casseb qui m'a ouvert les portes de son équipe brésilienne dans le cadre du projet d'immunophénotypage des cellules immunitaires d'individus infectés par HTLV-1. Travailler pendant 2 mois à l'étranger fut une expérience très enrichissante et je remercie chaleureusement Noemia Orii de m'avoir assisté au quotidien dans cette entreprise. Je remercie également le Dr. Tatiana Assone d'avoir organisé la collecte de sang auprès des individus infectés. De manière générale, je souhaite également remercier toutes les autres personnes qui ont égayé mon séjour.

Je remercie toutes les personnes, passées et présentes, que j'ai pu rencontrer au cours de ma thèse au sein de l'équipe Oncogenèse Rétrovirale. Je remercie le Dr. Chloé Journo pour nos multiples discussions, qu'elles soient scientifiques ou plus légères, mais souvent animées d'un soupçon de plaisanterie. Je remercie chaleureusement Sandrine, pour toutes les interventions

humaines et techniques qui ont participé à l'avancée de mes travaux de recherches, pour les pauses M&M's dont le nombre est simplement incalculable et bien sûr pour m'avoir supporté tout ce temps. Merci Amandine pour toutes les petites astuces techniques que tu m'as données et qui m'ont fait gagner un temps précieux à plusieurs reprises, mais aussi pour m'avoir fait prendre l'air lors de tes pauses cigarettes. Merci à Aurélien pour toutes les excursions au foyer auxquelles tu m'as convié, ton expertise viticole, et en dehors du sujet de l'alcool, nos discussions variées. Un grand merci à Gerges, qui aujourd'hui, laisse un grand vide au laboratoire, autrefois habité par un intrigant personnage aux allures extravagantes, toujours prêt à pousser la chansonnette. Merci à Loulou, ma co-bureau qui animait avec véhémence notre petit coin en bout de paillasse. Merci d'avoir contribué à tous mes délires, voire même de les sublimer. Merci à Elodie pour son talent inavoué à incruster des chansons (souvent de mauvaise qualité) dans la tête et de m'avoir succédé dans les fonctions de maitresse du café et de la pièce culture. Merci à Brice, de son vrai nom Boubou, d'avoir renforcer le niveau de testostérone de l'équipe et dont la force physique n'a d'égal que son intellect. Tu es l' élu de la Brophétie. Merci à Sarah, mon ancienne stagiaire, que j'ai pris plaisir à encadrer pendant deux mois. Enfin, je remercie également les gens dont la présence fut plus brève mais néanmoins fort sympathique : Sayo, Bertrand, Clara, Laurent, Edouard, Stefania, Victoria, Emilie, Julie. Sans quitter les horizons du laboratoire, je remercie particulièrement nos voisins de toujours, les LR, qui apportent une dynamique et une bonne humeur constante au sein de l'étage, et notamment en pièce culture, lieu culminant de nos interactions. Enfin, je remercie les différents membres du CIRI et de l'ENS avec qui j'ai pu converser au cours de cette thèse.

Ce dernier paragraphe s'adresse aux personnes qui ne sont pas directement liées au laboratoire, mais qui ont néanmoins contribué à enjoliver mes semaines. Je remercie tout particulièrement les membres du Club Rock avec qui j'ai eu le plaisir de dialoguer et de danser. Je remercie très chaleureusement les irréductibles Max et Elise, avec qui j'ai passé de très nombreux week-end, au détour de jeux de sociétés et/ou plusieurs bières, entre autres. Merci à Azra pour toute la nourriture délicieuse à laquelle j'ai eu l'opportunité de goûter. Un merci à toutes les personnes qui habitent loin, mais qui ont pris la peine de passer me voir à Lyon. Je remercie également mes parents, qui m'ont soutenu dans la filière biologique depuis mon entrée en L1, jusqu'à maintenant, et qui se demandent probablement encore sur quoi je travaille. Enfin, je te remercie, Morgane, pour m'avoir enduré dans les états de fatigues et de stress, surtout lors de la période de rédaction, mais aussi de m'avoir épaulé pendant ces trois ans de thèse (avec l'aide de Drina).  
À nos instants futurs.

# Table des matières

<b>Résumé .....</b>	<b>8</b>
<b>Summary .....</b>	<b>9</b>
<b>Abréviations .....</b>	<b>10</b>
<b>Table des figures et tableaux .....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>21</b>
1. Les infections virales chroniques : entre échappement au système immunitaire et développement de maladies .....	22
2. Description de HTLV-1 .....	24
2.1. Découverte et phylogénie .....	24
2.2. Épidémiologie et modes de transmission inter-individus .....	25
2.3. Organisation du génome et fonction des protéines virales .....	25
2.4. Tropisme cellulaire .....	29
2.5. Cycle viral .....	29
2.6. Transmission intercellulaire du virus .....	33
2.6.1. Transmission par le virus libre .....	33
2.6.2. Transmission par le contact cellule-cellule .....	33
2.7. Dissémination virale .....	38
2.8. Symptômes et traitements .....	40
2.8.1. ATLL .....	40
2.8.2. HAM/TSP .....	43
2.8.3. Autres maladies .....	44
2.9. Comparaison entre HTLV-1 et HTLV-2 .....	44
3. Le rôle de l'immunité dans le développement des maladies induites par HTLV-1 .....	47
3.1. ATLL .....	47

3.1.1. Importance de Tax et HBZ dans l'immortalisation et la transformation des cellules infectées .....	47
3.1.2. Le TGF- $\beta$ et l'IL-10 : des cytokines immunosuppressives au service de la pathogenèse .....	48
3.1.3. État des réponses T cytotoxiques et T régulatrices .....	49
3.1.4. Altérations de la réponse immunitaire innée .....	51
3.2. HAM/TSP .....	52
3.2.1. Facteurs de risque associés au développement de l'HAM/TSP .....	52
3.2.2. L'HAM/TSP est caractérisée par une signature pro-inflammatoire.....	52
3.2.3. État des réponses T cytotoxiques et T régulatrices .....	55
3.2.4. Altérations de la réponse immunitaire innée.....	56
3.3. À la frontière des deux maladies : balance entre pro-inflammation et immunosuppression .....	57
4. La réponse IFN-I .....	58
4.1. Généralités .....	58
4.2. Mécanisme de la réponse IFN-I.....	59
4.3. Fonctions des IFN-I .....	64
4.4. Importance de l'IFN-I dans le contrôle des infections virales .....	65
4.5. Importance de l'IFN-I dans les infections chroniques : bien contre mal ? .....	67
4.6. La réponse IFN-I dans le contexte de l'infection par HTLV-1 .....	71
4.6.1. L'IFN-I au service des individus infectés par HTLV-1 .....	71
4.6.1.1. L'IFN-I comme traitement de l'ATLL.....	71
4.6.1.2. L'IFN-I comme traitement de l'HAM/TSP .....	73
4.6.2. Mécanismes moléculaires du contrôle de l'infection de HTLV-1 par l'IFN-I .....	75
4.6.3. Altérations de la signalisation IFN-I .....	80
4.6.4. Altérations de la production d'IFN-I.....	81
4.6.5. Reconnaissance du virus HTLV-1 par des senseurs de l'immunité innée .....	84

5. La cellule dendritique plasmacytoïde.....	86
5.1. Ontogenèse et phénotype .....	86
5.2. Rôles .....	86
5.3. Fonctions des pDCs dans le contrôle immunitaire .....	88
5.3.1. Infection virale aiguë.....	88
5.3.2. Infection virale chronique .....	89
5.3.3. Activation des pDCs par les virus .....	91
5.4. Régulation de la réponse IFN-I induite par les pDCs .....	94
5.5. pDCs et cancer .....	98
<b>PROBLÉMATIQUE.....</b>	<b>101</b>
1. Activation des pDCs par HTLV-1 et HTLV-2.....	102
2. Immunophénotypage des cellules sanguines de patients HAM/TSP .....	102
<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>103</b>
1. Activation des pDCs par HTLV-1 et HTLV-2.....	104
1.1. Sensing of Cell-associated HTLV by Plasmacytoid Dendritic Cells is Regulated by Dense beta-Galactoside Glycosylation. Article soumis pour publication / Travaux en collaboration avec l'équipe de M. Dreux (CIRI, Lyon, France).....	104
1.2. Résultats complémentaires.....	160
1.2.1. Introduction .....	160
1.2.2. Matériels et méthodes.....	160
1.2.3. Résultats .....	162
1.2.4. Conclusion.....	168
2. Immunophénotypage des cellules sanguines de patients HAM/TSP .....	169
2.1. Introduction.....	169
2.2. Matériels et méthodes .....	169
2.3. Résultats.....	172

2.4. Conclusion .....	182
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>183</b>
1. Activation des pDCs par les cellules infectées par HTLV-1 .....	184
2. Vers une différence entre HTLV-1 et HTLV-2 dans l'activation des pDCs ?.....	188
3. L'antigène TF au cœur de la régulation de la réponse IFN-I ? .....	189
4. Vers la découverte de nouveaux biomarqueurs de l'HAM/TSP ? .....	194
5. Repositionnement de la fonction des pDCs dans la symptomatologie viro-induite .....	196
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>201</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>229</b>



## Résumé

Le virus T-lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1) est l'agent étiologique de deux principales maladies : la leucémie/lymphome à cellules T de l'adulte (ATLL) et la paraparésie spastique tropicale/myélopathie associée à HTLV-1 (HAM/TSP). Ces deux maladies sont caractérisées par des phénotypes immunitaires opposés, puisque l'ATLL est associée à une immunosuppression et l'HAM/TSP à une réponse pro-inflammatoire. Les mécanismes qui déterminent l'évolution de l'infection chronique vers l'une ou l'autre de ces maladies sont peu connus. L'interféron de type 1 (IFN-I) a une fonction ambiguë dans l'organisme. Si cette cytokine contribue à la réponse immunitaire précoce, elle est également associée au développement de maladies pour des infections virales persistantes. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) ont la particularité de produire de grandes quantités d'IFN-I après la reconnaissance de cellules infectées par des virus. Nous avons montré que ceci était également vrai pour HTLV-1, puisque le contact entre une cellule infectée par HTLV-1 et la pDC est nécessaire à la production d'IFN-I. Cette production est induite par la particularité de HTLV-1 à s'accumuler en surface des cellules infectées, au sein d'une structure préalablement définie sous le terme de biofilm viral. La nature de la matrice extracellulaire dans laquelle est accumulée le virus régule la réponse IFN-I par les pDCs, la présence de l'antigène Gal $\beta$ (1-3)GalNAc désialylé à la surface des cellules infectées contribuant à réduire cette réponse IFN-I. Nous avons également observé que des cellules infectées par le virus HTLV-2, virus phylogénétique proche de HTLV-1 mais peu pathogène, tendent à induire une plus faible production d'IFN-I, mais une meilleure maturation des pDCs. Nous avons enfin montré que la fréquence des pDCs dans le sang et leur capacité à répondre à un stimulus est similaire chez des patients HAM/TSP, des porteurs asymptomatiques et des individus sains. Ces résultats contrastent avec des études antérieures qui montrent une diminution de la fréquence des pDCs chez les patients ATLL et une diminution de leur activité chez les individus infectés. Le nombre et la fonction des pDCs pourraient ainsi contribuer à l'orientation de la pathogenèse vers l'ATLL ou l'HAM/TSP.

## Summary

HTLV-1 (Human T-lymphotropic virus type 1) is the etiological agent of two main diseases: the adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) and the HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, which are characterized by different immune phenotypes. While the ATLL is linked to an immunosuppressive state, the HAM/TSP is linked to a pro-inflammatory state in patients. The mechanisms contributing to the development of these two diseases in the HTLV-1 infected individuals are poorly understood. Type I interferon (IFN-I) has ambivalent functions in the organism. While this cytokine is an effector of early immune responses, several studies have reported a negative impact of this cytokine during chronic infections. The plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are the main producers of IFN-I *in vivo*, and can produce high amounts of this cytokine after the recognition of virally infected cells. We have shown that pDCs are able to recognize HTLV-1-infected cells, thus leading to the production of IFN-I. pDCs' triggering is mediated by the accumulated viral particles at the surface of the infected cells, within a carbohydrate-rich structure, previously described as the viral biofilm. The nature of the extracellular matrix itself seems to regulate IFN-I production by pDCs, since the exposition of an asialylated Gal $\beta$ (1-3)GalNAc glycan at the surface of the HTLV-infected cells reduces the IFN-I production. We also observed that HTLV-2 (a close relative of HTLV-1)-infected cells, in contrast to HTLV-1-infected cells, tend to induce a lower production of IFN-I after being recognized by the pDCs but a greater maturation of the latter. Finally, we have shown that pDCs' frequency in the blood and their ability to produce IFN- $\alpha$  after an *ex vivo* stimulation is equivalent in healthy donors, asymptomatic HTLV-1 carriers and HAM/TSP patients. This result contrasts with previous studies which demonstrated that blood circulating pDCs' frequency is reduced in ATLL patients and that pDCs from HTLV-1 infected individuals have a reduced ability to produce IFN- $\alpha$  after stimulation. Thus, dysregulation of the frequency and functionality of pDCs could contribute to the development of one disease or the other.

## Abréviations

### A

AC : Porteurs asymptomatiques

ADAR1 : Adenosine Deaminase Acting on RNA 1

ADCC : Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity

AIM2 : Absent in Melanoma 2

ALR : AIM2-like Receptor

AMP : Doxorubicine, Ranimustine, Prédnisone

AP-1 : Activator Protein 1

APH-2 : Antisens Protein of HTLV-2

APOBEC3G : Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme, Catalytic polypeptide-like 3G

ATLL : Leucémie/Lymphome à cellules T de l'adulte

AZT : Azidothymidine/Zidovudine

### B

Bax : Bcl-2-Associated X protein

BCR : B-cell Receptor

BDCA : Blood Dendritic Cell Antigen

BLNK : B-cell Linker protein

BSA : Bovine Serum Albumin

BST2 : Bone marrow Stromal cell antigen 2

BTK : Bruton's Tyrosine Kinase

### C

CA : Protéine de capsid

CADM1 : Cell Adhesion Molecule 1

CBMCs : Cord Blood Mononuclear Cells

CBP : CREB Binding Protein

CCL : C-C motif chemokine Ligand

CCR : CC chemokine Receptor

CD : Cluster of Differentiation

cDC : Cellule dendritique conventionnelle

CDP : Common Dendritic cell Progenitor  
cGAMP : cyclic GMP-AMP  
cGAS : Cyclic GMP-AMP Synthase  
CHOP : Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine, Prédnisone  
CIITA : Class II Transactivator  
CLR : C-type Lectin Receptor  
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
CMV : Cytomégalovirus  
CREB : cAMP Response Element-Binding protein  
CRD : Carbohydrate Recognition Domain  
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats  
CTL : Lymphocyte T cytotoxique  
CXCL : C-X-C motif chemokine Ligand  
CXCR : C-X-C chemokine Receptor

## **D**

DAPI2 : DNAX Activation Protein 12  
DCIR : Dendritic Cell Immunoreceptor  
DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin  
DENV : Dengue virus  
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DPBS : Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline  
DR6 : Death Receptor 6

## **E**

EBV : Virus d'Epstein-Barr  
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase  
ERV : Élément rétroviral endogène

## **F**

FcεRI : High-affinity IgE receptor  
FcεRIγ : γ chains of the FcεRI  
FMO : Fluorescence Minus One

Foxp3 : Forkhead box p3

## **G**

Gal : Galactose

GalNac : N-acétylgalactosamine

GAS : Gamma interferon Activation Site

GlcNac : N-acétylglucosamine

GLUT-1 : Transporteur de glucose de type 1

## **H**

HAM/TSP : Myélopathie associée à HTLV-1/Paraparésie spastique tropicale

HAT : Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine

HAV : Virus de l'hépatite A

HBV : Virus de l'hépatite B

HBZ : HTLV-1 Basic Leucine Zipper Factor

HCV : Virus de l'hépatite C

HD : Donneurs sains

HEK293T : Human Embryonic Kidney 293T

HEV : Virus de l'hépatite E

HIV : Virus de l'immunodéficience humaine

HLA : Human Leukocyte Antigen

HSPGs : Protéoglycanes à héparane sulfate

HSV : Herpes Simplex Virus

HTLV : Virus T-lymphotrope humain

## **I**

ICAM1 : Inter-Cellular Adhesion Molecule 1

ICOS-L : Inducible T-cell Costimulator Ligand

ID2 : Inhibitor of DNA binding 2

IFI16 : Interferon- $\gamma$  Inducible protein 16

IFN : Interféron

IFNAR : IFN-I Receptor

IFN $\gamma$ R : IFN- $\gamma$  Receptor

IKK- $\epsilon$  : Inhibitory  $\kappa$ B kinase  $\epsilon$   
IL : Interleukine  
ILT3/7 : Immunoglobulin-Like Transcript 3/7  
ILTs : IL-2 dependent HTLV-1-infected T-cells  
iNKT : Invariant Natural Killer T  
IRAK : Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase  
IRF : Interferon Regulatory Factor  
ISG : Interferon Stimulated Gene  
ISGF3 : IFN-Stimulated Gene Factor 3  
ISRE : IFN-Stimulated Response Elements  
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif  
ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif

## **J**

JAK : Janus kinases

## **L**

LAG3 : Lymphocyte-Activation Gene 3  
LAIR-1 : Leukocyte-Associated Immunoglobulin-like Receptor 1  
LCMV : Virus de la chorioméningite lymphocytaire  
LFA-1 : Lymphocyte Function-associated Antigen 1  
Lin : Lineage  
LTR : Long Terminal Repeat

## **M**

MA : Protéine de matrice  
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases  
Man : Mannose  
Man<sub>3</sub> : Mannotriose  
MAVS : Mitochondrial Antiviral-Signaling Protein  
MCMV : Murine Cytomegalovirus  
MDA5 : Melanoma Differentiation-Associated protein 5  
MDDCs : Monocyte-Derived Dendritic Cells

MEF : Mouse Embryonic Fibroblast  
MEK : Mitogen-activated protein kinase kinase  
MFI : Median/Mean Fluorescence Intensity  
MMP : Matrix Metalloproteinase  
MOI : Multiplicity of infection  
MTOC : Centre organisateur des microtubules  
MyD88 : Myeloid Differentiation primary response 88

## **N**

NC : Protéine de nucléocapside  
NCR : Natural Cytotoxicity Receptors  
NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells  
NK : Natural Killer  
NKG2D : Natural Killer Group 2 Member D  
NLR : Nod-like Receptor  
NRP-1 : Neuropiline-1  
NVD : Newcastle Disease Virus

## **P**

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern  
PBMCs : Peripheral Blood Mononuclear Cells  
P/CAF : p300/CBP-Associated Factor  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PD-1 : Programmed Death 1  
pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde  
PD-L : Programmed Death Ligand  
PHA : Phytohémagglutinine  
PI3K : Phospho-inositide 3-Kinase  
PKC : Protein Kinase C  
PKR : Protein Kinase R  
PLC $\gamma$  : Phospholipase C $\gamma$   
PMA : Phorbol 12-Myristate 13-Acetate  
Poly(I:C) : Polyinosinic-polycytidylic acid

pre-DC : Predendritic Cell  
PRR : Pattern Recognition Receptor

## **R**

RBD : Receptor Binding Domain  
RIG-I : Retinoic acid Inducible Gene-I  
RIP1 : Receptor-Interacting Protein 1  
RLR : RIG-I-Like Receptor  
RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium  
RSV : Respiratory Syncytial Virus  
RxRE : Rex Responsive Element

## **S**

SAMHD1 : SAM domain and HD domain-containing protein 1  
SHIP : Src homology 2 domain containing inositol 5-phosphatase  
SHP : Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase  
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise  
SIV : Virus de l'immunodéficience simienne  
SNC : Système nerveux central  
SOCS1 : Suppressor of Cytokine Signaling 1  
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription  
STING : Stimulator of Interferon Genes  
STLV : Virus T-lymphotrope simien  
SU : Domaine de surface  
SVF : Sérum de veau foetal  
Syk : Spleen tyrosine kinase

## **T**

TApDCs : Tumor-Associated pDCs  
T-bet : T-box Transcription Factor  
TBK1 : Tank-binding kinase 1  
TCR : T-cell Receptor  
TF (antigène) : Thomsen-Friedenreich



TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor- $\beta$

Th : T helper

TIGIT : T-cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains

TIM-3 : T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3

TIR : Toll/Interleukin-1 Receptor

TLR : Toll-Like Receptor

TM : Domaine transmembranaire

TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

TRAF : Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor

TRAIL : Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand

Treg : T régulateur

TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$

TRIM22 : Tripartite Motif containing 22

TRIM5 $\alpha$  : Tripartite Motif containing 5 $\alpha$

TYK2 : Tyrosine Kinase 2

## **V**

VCAP : Vincristine, Cyclophosphamide, Doxorubicine, Prédnisone

VECP : Vindésine, Étoposide, Carboplatine, Prédnisone

VSV : Virus de la Stomatite Vésiculaire

## **W**

WT : Wild Type

## **Y**

YFV : Yellow Fever Virus

## Table des figures et tableaux

Figure 1 : Prévalence de différentes infections virales persistantes dans le monde.....	24
Figure 2 : Particule virale de HTLV-1 .....	26
Figure 3 : Séquences codantes du provirus de HTLV-1 et ARNm produits après transcription.....	27
Figure 4 : Étapes de l'entrée virale et domaines d'interaction entre SU et les récepteurs de HTLV-1 .....	30
Figure 5 : Cycle viral de HTLV-1 .....	32
Figure 6 : Transmission de HTLV-1 par l'intermédiaire de la synapse virale.....	35
Figure 7 : Transmission de HTLV-1 par l'intermédiaire du conduit cellulaire .....	36
Figure 8 : Transmission de HTLV-1 par l'intermédiaire du biofilm viral .....	37
Figure 9 : Étapes de dissémination du virus HTLV-1 dans l'organisme .....	38
Figure 10 : Observation au microscope de cellules leucémiques dans le sang d'un patient avec un ATLL.....	41
Figure 11 : Taux de survie sur 5 ans des patients ATLL qui suivent un traitement chimiothérapeutique ou antiviral (AZT + IFN- $\alpha$ ) .....	42
Figure 12 : Divergences dans la fréquence et l'abondance des clones lors des infections par HTLV-1 et HTLV-2 .....	45
Figure 13 : Devenirs de l'infection par les virus HTLV-1 et HTLV-2 .....	46
Figure 14 : Échappement des cellules transformées par HTLV-1 à la réponse cytotoxique .....	48
Figure 15 : Échappement des cellules transformées par HTLV-1 au contrôle immunitaire .....	51
Figure 16 : Modèle de la pathogenèse de l'HAM/TSP .....	55
Figure 17 : Dichotomie de certains paramètres immunitaires entre les patients ATLL et HAM/TSP.....	58
Figure 18 : Induction de l'expression de l'IFN-I après activation des PRRs.....	62
Figure 19 : Cascade de signalisation induite par l'IFN-I .....	64
Figure 20 : Fonctions de l'IFN-I .....	65
Figure 21 : L'IFN-I inhibe la réponse T-cytotoxique à travers l'activité des cellules présentatrices d'antigène .....	70
Figure 22 : Conséquences d'un traitement antiviral des patients ATLL.....	72

Figure 23 : Impacts différentiels de l'IFN- $\alpha$ et de l'IFN- $\beta$ sur le traitement des patients HAM/TSP. ....	75
Figure 24 : Effets de l'IFN- $\alpha$ exogène dans le contexte de l'infection par HTLV-1 .....	77
Figure 25 : Cycle viral de HTLV-1 et facteurs de restriction .....	79
Figure 26 : Inhibition de la signalisation IFN-I par HTLV-1 .....	81
Figure 27 : Mécanismes d'inhibition et de stimulation de la production d'IFN-I par les protéines Tax et HBZ.....	84
Figure 28 : Fonctions des pDCs .....	87
Figure 29 : Activation de la pDC par les virus.....	93
Figure 30 : Mécanisme de régulation de la production d'IFN-I après activation des récepteurs régulateurs à la surface des pDCs .....	95
Figure 31 : Développement tumoral associé aux pDCs infiltrées dans les tumeurs .....	99
Figure 32 : L'activation de la pDC par la lignée C19 est dépendante de TLR-7.....	162
Figure 33 : Le surnageant de la lignée C19 ne suffit pas à reproduire la plus faible activation des pDCs par ces cellules .....	163
Figure 34 : La stimulation des pDCs par des cellules infectées par HTLV-1 et HTLV-2 induit l'expression de TRAIL.....	164
Figure 35 : La stimulation des pDCs par des cellules infectées par HTLV-1 et HTLV-2 induit l'expression de marqueurs de maturation.....	165
Figure 36 : L'activation des pDCs par la lignée C19 induit une diminution de la fréquence de pDCs positives pour l'expression de BDCA-2 en surface .....	166
Figure 37 : Effet antiviral de l'IFN-I produit par les pDCs après coculture avec du R848 ou des lignées infectées par HTLV-1 et HTLV-2 .....	167
Figure 38 : Âge des individus recrutés pour chaque catégorie clinique.....	172
Figure 39 : Mesure de la charge provirale des individus infectés symptomatiques et asymptomatiques.....	173
Figure 40 : Stratégie d'analyse hiérarchique des différentes populations cellulaires de l'immunité adaptative par cytométrie .....	174
Figure 41 : Stratégie d'analyse hiérarchique de différentes populations cellulaires de l'immunité innée par cytométrie .....	175
Figure 42 : Fréquence des populations immunitaires circulantes .....	176
Figure 43 : Expression d'IL-12 et de TNF- $\alpha$ par les cellules cDC1 et NK.....	178
Figure 44 : Expression d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ par les lymphocytes T $\gamma\delta$ .....	179
Figure 45 : Expression d'IL-17A par les lymphocytes T CD4+ et CD8+ mémoires.....	180

Figure 46 : Expression de l'IFN- $\alpha$ par les pDCs.....	180
Figure 47 : Modèles hypothétiques de l'implication de NRP-1 pour l'entrée du virus dans la pDC .....	187
Figure 48 : Activation différentielle des pDCs par les cellules infectées par HTLV-1 et HTLV-2.....	189
Figure 49 : Conformations masquée et non masquée de l'antigène TF .....	190
Figure 50 : Représentation schématique des sites putatifs d'O-glycosylation sur les glycoprotéines d'enveloppe de HTLV-1 et HTLV-2.....	192
Figure 51 : Modèle d'inhibition de la production d'IFN-I par la pDC après reconnaissance des cellules C19.....	194
Figure 52 : Modèle d'intégration des pDCs dans la pathogenèse induite par HTLV-1.....	200

Tableau 1 : Panels d'anticorps utilisés pour le marquage de surface des populations immunitaires adaptatives et innées.....	171
Tableau 2 : Panels d'anticorps utilisés pour le marquage intracellulaire des populations immunitaires adaptatives et innées.....	171
Tableau 3 : Sécrétions cytokiniques par les cellules immunitaires à l'état basal ou après stimulation.....	181



# **INTRODUCTION**

## **1. Les infections virales chroniques : entre échappement au système immunitaire et développement de maladies**

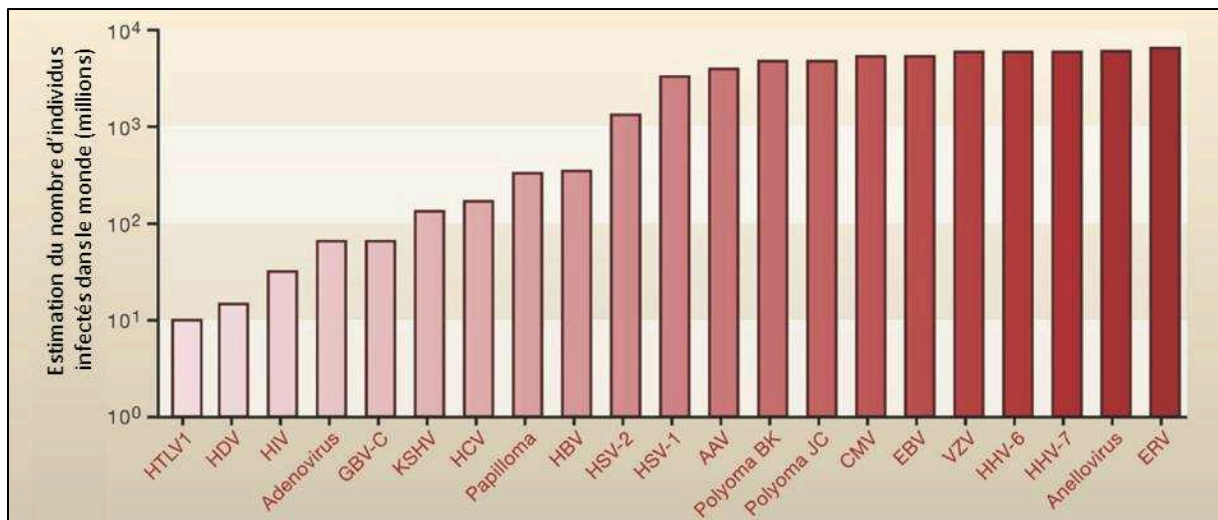
L'infection d'un organisme par un virus peut se caractériser par trois devenir différents : la clairance du virus par l'hôte, la mort de l'hôte ou la mise en place d'une infection virale chronique. Tandis que les deux premiers scénarios aboutissent à la mort d'une des deux parties, le dernier permet la survie à la fois du virus et de son hôte, contribuant ainsi à la mise en place d'un processus de parasitisme réussi. Trois stratégies virales différentes permettent de définir une infection virale chronique : une réplication virale persistante, un processus de latence viro-induit ou l'intégration d'éléments viraux dans l'ensemble des cellules de l'hôte ([Pour Revue : Virgin et al., 2009](#)). Chez l'homme, les virus de l'hépatite C (HCV), de l'hépatite B (HBV) et de l'immunodéficience humaine (HIV) utilisent la stratégie de réplication virale persistante, qui se définit par la production de nouveaux virus et d'évènements d'infection cellulaire de manière continue, exposant cependant le virus à la réponse immunitaire de l'hôte ([Pour Revue : Rehermann and Nascimbeni, 2005](#)). La latence viro-induite correspond à un état d'inhibition transcriptionnel de la majorité des gènes viraux dans la cellule infectée. C'est une caractéristique partagée par les différents membres de la famille des Herpesviridae ([Pour Revue : Grey, 2015](#)). Des éléments rétroviraux endogènes (ERVs) sont présents dans l'ensemble des cellules de l'hôte et sont issus d'un évènement de transmission verticale après infection de cellules germinales. De nombreux ERVs composent le génome des mammifères, mais ceux-ci sont très fréquemment mutés et déficients dans la production des protéines virales ([Pour Revue : Meyer et al., 2017](#)). Les trois stratégies ne sont pas exclusives. En effet, les virus HIV et HBV peuvent persister dans l'hôte à la fois via une réplication virale persistante et un mécanisme de latence virale ([Chun et al., 1997](#) ; [Marusawa et al., 2000](#)). Comprendre comment certains virus arrivent à persister dans leur hôte malgré la présence d'une réponse immunitaire reste un questionnement scientifique d'actualité.

La localisation du site d'infection, la cinétique de la réponse immunitaire et son amplitude, en parallèle de la vitesse de réplication virale, sont des éléments clés dans la mise en place potentielle d'une infection chronique ([Pour Revue : Virgin et al., 2009](#)), qui, in fine, est la résultante directe d'un échappement viral à la réponse immunitaire. Certaines protéines virales peuvent contrer la reconnaissance de la cellule infectée par les cellules immunitaires effectrices, inhiber la présentation antigénique, agir comme agonistes ou antagonistes de diverses cytokines et chimiokines ou encore bloquer les effets antiviraux de l'interféron (IFN). D'un point de vue

purement viral, l'échappement à la réponse immunitaire peut aussi se faire par la génération de quasi-espèces, conséquence de la faible fidélité de certaines polymérases virales. De manière générale, l'expression de protéines virales lors des infections persistantes, notamment observée pour HBV, HCV ou HIV chez l'homme, est couplée dans l'organisme avec une stimulation antigénique continue des lymphocytes, ainsi qu'une production de cytokines pro-inflammatoires et de molécules de stimulation qui peuvent altérer le système immunitaire. Le système immunitaire doit être calibré de sorte à contrôler la réplication virale, sans pour autant léser les tissus infectés ou avoisinants. Si la réponse immunitaire de l'hôte et la réplication virale semblent être dans un état d'équilibre lors de l'infection virale chronique, c'est une véritable dynamique qui opère, pour laquelle des changements mineurs peuvent avoir des conséquences importantes (Pour revue : Zuniga et al., 2015 ; Pour Revue : Virgin et al., 2009). Le niveau et la nature des cytokines dans le sang et les tissus figurent parmi les éléments qui peuvent influencer cette dynamique par exemple, puisque ces dernières peuvent entraîner des variations dans l'ensemble des fonctions immunitaires. Une stimulation continue de la réponse immunitaire peut être délétère lors des infections virales chroniques. En effet, l'activation continue de la réponse cytotoxique peut être à l'origine de dommages tissulaires conséquents. Des mécanismes régulateurs existent cependant pour prévenir ces dommages. Lors des infections chroniques, la fonction des lymphocytes T cytotoxiques peut être inhibée par des cytokines immunosuppressives et l'expression de récepteurs inhibiteurs par exemple (Pour Revue : Virgin et al., 2009 ; Pour revue : Wherry and Kurachi, 2015). Ainsi, une trop forte activation, ou au contraire une trop forte inhibition de la réponse immunitaire lors des infections virales chroniques peuvent être à l'origine du développement de maladies, généralement plusieurs années après la primo-infection.

De manière intéressante, les infections virales chroniques les plus prévalentes dans la population humaine ne sont associées à aucune maladie, à de rares cas de maladies ou provoquent des maladies chez les individus immunosupprimés seulement (Pour Revue : Virgin et al., 2009). Parmi ces virus, on retrouve notamment les ERVs et les membres des Herpesviridae, tels que le Cytomégalovirus (CMV) ou le virus d'Epstein-Barr (EBV). En revanche, les virus dont l'infection chronique aboutit fréquemment aux développements de maladies (HCV, HBV, HIV) ont une prévalence mondiale plus faible (**Figure 1**).





**Figure 1** : Prévalence de différentes infections virales persistantes dans le monde. **Adapté de Virgin et al., 2009.**

Parmi ces derniers, on retrouve le virus T-lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1), un virus dont l'infection chronique est à l'origine du développement de deux principales maladies aux phénotypes immunitaires opposés : la leucémie/lymphome à cellules T de l'adulte (ATLL) et une myélopathie associée à HTLV-1 également nommée paraparésie spastique tropicale (HAM/TSP). Les mécanismes qui sous-tendent la pathogenèse induite par HTLV-1 ne sont pas complètement élucidés, d'autant que moins de 10 % des individus infectés vont développer des symptômes (Pour revue : Futsch et al., 2017).

## 2. Description de HTLV-1

### 2.1. Découverte et phylogénie

Le virus HTLV-1 a été caractérisé pour la première fois en 1979 par l'équipe de Robert Gallo (Poiesz et al., 1980). Initialement caractérisé dans une culture de lymphocytes issus d'un lymphome cutané, HTLV-1 a pu être isolé dans plusieurs cultures de cellules primaires issues de patients présentant une prolifération maligne des lymphocytes T CD4+ (CD pour Cluster of Differentiation) (Pour revue : Gallo, 2005). L'idée d'une association entre le virus et cette maladie fut consolidée par la séropositivité de plusieurs patients qui présentaient une leucémie à cellules T de l'adulte (Yoshida et al., 1982). HTLV-1 fut ainsi le premier rétrovirus humain oncogène à avoir été mis en évidence. Il appartient à la famille des Retroviridae, à la sous

famille des Orthoretrovirinae et au genre des Deltaretrovirus. Ce virus est initialement apparu dans la population humaine après transmission zoonotique depuis la population simienne, son homologue simien portant le nom de STLV-1 (Virus T-lymphotrope simien de type 1) (Pour revue : Vandamme et al., 1998).

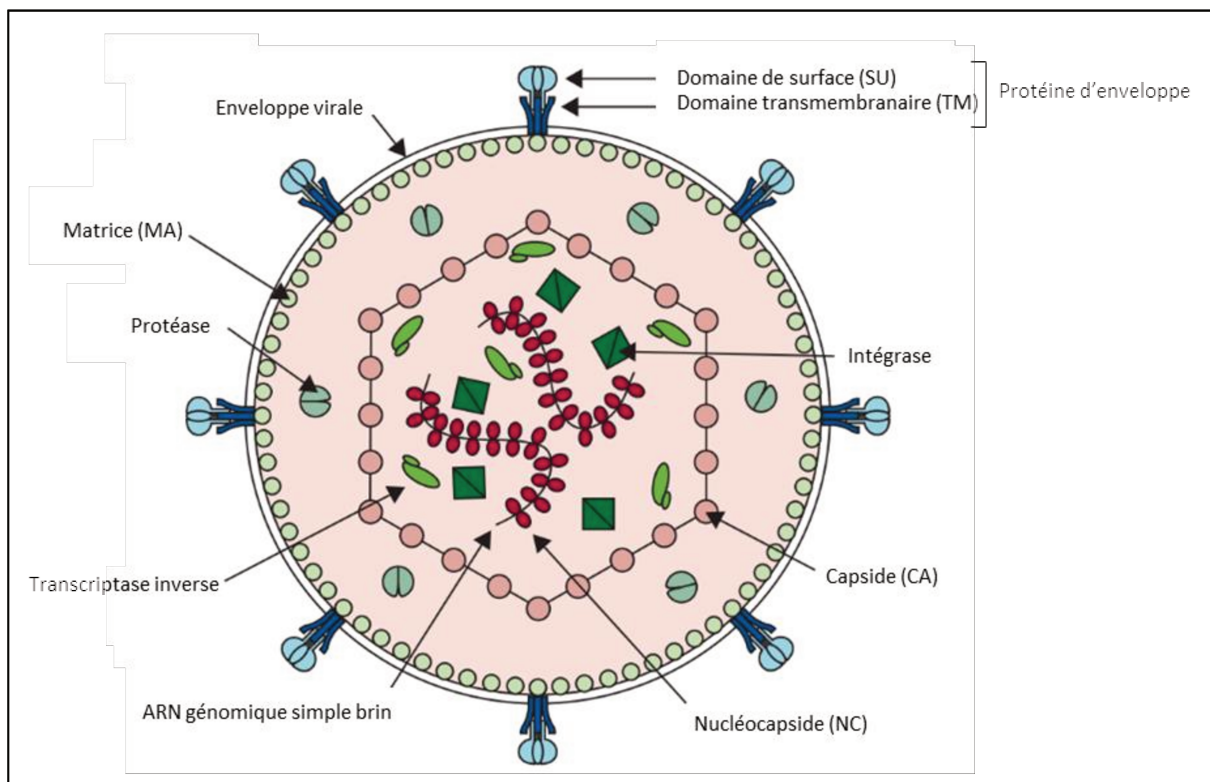
## **2.2. Épidémiologie et modes de transmission inter-individus**

Le nombre d'individus infectés par HTLV-1 dans le monde a récemment été estimé entre 5 et 10 millions (Pour revue : Gessain and Cassar, 2012). La distribution des individus infectés n'est pas homogène à la surface du globe, l'infection par HTLV-1 étant associée à des foyers endémiques. Les individus infectés sont principalement situés dans le Sud-Ouest du Japon, en Afrique sub-saharienne, dans les Caraïbes et en Amérique du Sud. Des foyers d'infection plus restreints sont situés dans le Moyen-Orient et en Océanie. Trois modes de transmission entre un individu infecté et un individu non infecté ont été décrits pour HTLV-1 : une transmission de la mère à l'enfant par l'allaitement prolongé, une transmission par voie sexuelle et une transmission par contamination sanguine. Pour réduire l'incidence de HTLV-1, plusieurs mesures ont été développées. Dans un premier temps, l'analyse de la sérologie des donneurs de sang dans certains pays a permis de réduire de manière considérable le nombre de nouvelles infections après transfusion sanguine (Pour revue : Murphy, 2016). Au Japon, et pour limiter la transmission de la mère à l'enfant, une analyse sérologique de la mère est effectuée, puis, si celle-ci s'avère positive, plusieurs solutions peuvent être proposées (réduction du temps de l'allaitement naturel, alternatives à l'allaitement naturel) (Satake et al., 2016). Enfin, des associations de patients mènent des campagnes qui visent à informer le public des conséquences de l'infection par HTLV-1 (Grupo Vitamore au Brésil, NPO Smile Ribbon au Japon).

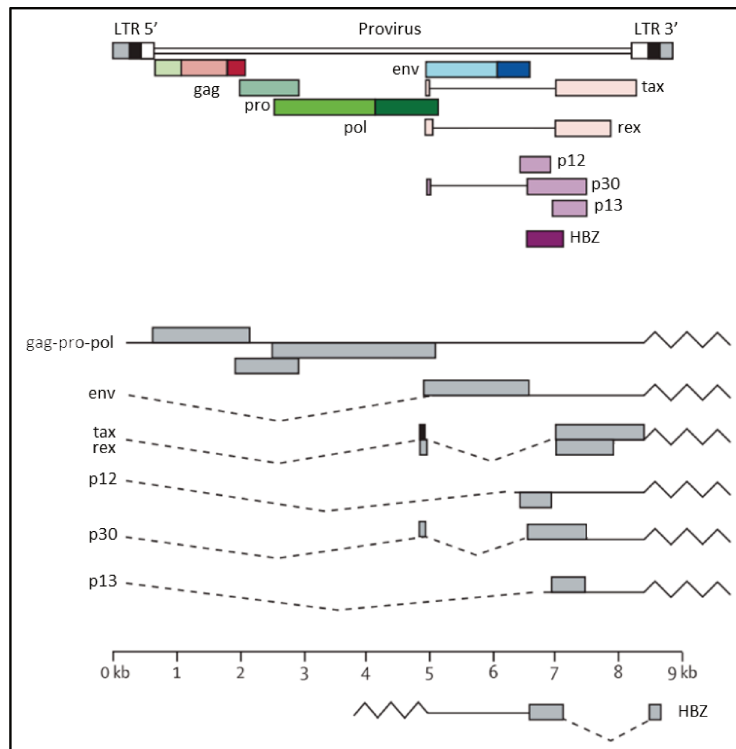
## **2.3. Organisation du génome et fonction des protéines virales**

Le provirus de HTLV-1, c'est-à-dire le génome viral intégré dans le génome de la cellule, contient des séquences codantes flanquées de deux régions terminales répétées (LTR), ces dernières contenant notamment les régions promotrices de la transcription virale. Plusieurs protéines sont codées par le génome proviral de HTLV-1 (Pour revue : Matsuoka and Jeang, 2007 ; Pour revue : Verdonck et al., 2007). La particule virale de HTLV-1 est composée des protéines de capsid p24 (CA), de nucléocapsid p15 (NC) et de matrice p19 (MA), codées à partir du gène gag, et qui encerclent l'ARN viral génomique dimérique de polarité positive. À

l'intérieur de la capsid sont également présentes des enzymes virales, codées à partir des gènes pol et pro, à savoir la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase, qui assurent respectivement les étapes de rétrotranscription, d'intégration du génome viral dans le génome de l'hôte et de maturation des particules virales. HTLV-1 est un virus enveloppé puisque la capsid proprement dite est entourée d'une portion de la membrane plasmique de la cellule infectée. Dans cette membrane sont insérées les protéines de l'enveloppe virale, codées à partir du gène env. La protéine d'enveloppe est divisée en un domaine transmembranaire (TM) et un domaine de surface (SU) (**Figure 2**). La région pX du génome contient plusieurs gènes qui codent les protéines régulatrices Tax et Rex et les protéines auxiliaires p8/p12, p13 et p30. Enfin la protéine HBZ (HTLV-1 Basic Leucine Zipper Factor) est traduite à partir de la transcription du brin antisens depuis le promoteur LTR en 3' (**Figure 3**).



**Figure 2** : Particule virale de HTLV-1. La particule virale de HTLV-1 contient un ARN viral dimérique directement associé à la protéine de nucléocapside (NC). Ces deux composants sont englobés par les protéines de capsid (CA) et de matrice (MA). La particule virale est enveloppée, c'est-à-dire recouverte d'une bicouche lipidique, dans laquelle sont insérées les protéines de l'enveloppe virale, chacune composée d'un domaine de surface (SU) et d'un domaine transmembranaire (TM). La particule virale contient également des enzymes virales : la transcriptase inverse, la protéase et l'intégrase. **Adapté de Verdonck et al., 2007.**



**Figure 3** : Séquences codantes du provirus de HTLV-1 (en haut) et ARNm produits après transcription (en bas). Le génome est flanqué de part et d'autre de deux régions promotrices : les LTRs 5' et 3'. La transcription initiée à partir du LTR 5' permet l'expression des gènes gag, pro, pol, env, tax, rex, p12, p13 et p30. La transcription initiée à partir du LTR 3' permet l'expression du gène hbz. Les transcrits peuvent être non-épissés, mono-épissés ou doublement épissés. La synthèse des protéines Gag, Gag-Pro et Gag-Pro-Pol se fait à partir du même transcrit noté gag-pro-pol, et fait intervenir des événements de décalages du cadre de lecture. Les couleurs des séquences codantes sont similaires aux protéines de la particule virale schématisée dans la Figure 2. **Adapté de Verdonck et al., 2007.**

La protéine Tax est une oncoprotéine aux fonctions diverses (Pour revue : Curren et al., 2012). Tax favorise la transcription virale via l'activation du LTR, active la voie NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B), régule le cycle cellulaire, réduit la réponse aux dommages de l'ADN et inhibe l'apoptose. De manière globale, Tax participe ainsi à la réplication virale, puisqu'il favorise la production de protéines virales et in fine de particules virales, prévient la mort de la cellule infectée par apoptose et induit la multiplication cellulaire.

Rex favorise l'export des ARNm viraux du noyau vers le cytoplasme par la reconnaissance d'un motif RxRE (Rex Responsive Element), uniquement présent sur les ARNm de HTLV-1 (Pour revue : Nakano and Watanabe, 2016). Rex contribue également à la stabilité des ARNm viraux dans le cytoplasme, en inhibant leur dégradation. En plus de ces fonctions, Rex favorise

la production préférentielle d'ARNm viraux partiellement ou non épissés, qui supportent la production des protéines virales structurales.

Les protéines p8 et p12 sont issues d'un même cadre de lecture dans la région pX, p8 étant issue du clivage protéolytique de p12. Au niveau du réticulum endoplasmique, p12 favorise une augmentation du niveau de calcium intra-cytosolique, ce qui stimule l'activité du facteur NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells), contribuant ainsi à l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T, mais stimule aussi l'activation du LTR par la protéine p300, contribuant ainsi à la réplication virale (Pour revue : Edwards et al., 2011 ; Pour revue : Rosadas and Puccioni-Sohler, 2015 ; Pour revue : Bai and Nicot, 2012). Les protéines p8 et p12 favorisent également l'activation de la protéine STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5), qui contribue à la prolifération cellulaire. De plus, p8 et p12 participent à l'échappement de la cellule infectée à la réponse immunitaire, puisque ces deux protéines assurent la sous-expression des récepteurs ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1) et CMH-I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I) à la surface cellulaire, permettant une inhibition des réponses cytotoxiques induites par les cellules NK (Natural Killer) et lymphocytes T cytotoxiques, respectivement.

La protéine p13 limite l'activation transcriptionnelle du LTR par Tax en inhibant son interaction avec les facteurs CBP (CREB Binding Protein)/p300 et en inhibant l'export des ARNm de Tax et Rex, ce qui limite par conséquent leur expression (Pour revue : Edwards et al., 2011 ; Pour revue : Bai and Nicot, 2012). De plus, p13 possède une fonction pro-apoptotique, puisque cette protéine induit la production de dérivés réactifs de l'oxygène dans les mitochondries des cellules transformées par HTLV-1. Ces deux fonctions de p13 lui confèrent donc des propriétés antivirales, mais qui contribuent cependant à éviter la propagation de cellules transformées, ce qui serait délétère pour l'hôte.

La protéine p30 inhibe la transcription des gènes viraux en limitant la fixation du complexe Tax/CREB (cAMP Response Element-Binding protein)/p300 sur le LTR viral et en inhibant l'export des ARNm de Tax et Rex, ce qui limite par conséquent leur expression (Pour revue : Edwards et al., 2011 ; Pour revue : Bai and Nicot, 2012). En plus de ses propriétés favorisant la latence virale, p30 inhibe la progression dans le cycle cellulaire et interfère avec les mécanismes de réparation de l'ADN. Par ce biais, p30 pourrait contribuer à l'accumulation de mutations dans le génome cellulaire, caractéristique des cellules transformées par HTLV-1.

La protéine HBZ inhibe l'activation transcriptionnelle du LTR par Tax, inhibe l'export des ARN viraux par Rex, inhibe l'activité de NF- $\kappa$ B, inhibe l'apoptose et l'autophagie, inhibe l'intégrité génomique et module la réponse immunitaire (Pour revue : Ma et al., 2016 ; Pour revue : Giam and Semmes, 2016 ; Pour revue : Matsuoka and Jeang, 2007). En plus de servir de matrice à la synthèse protéique, l'ARNm de HBZ présente des fonctions lymphoprolifératives et anti-apoptotiques.

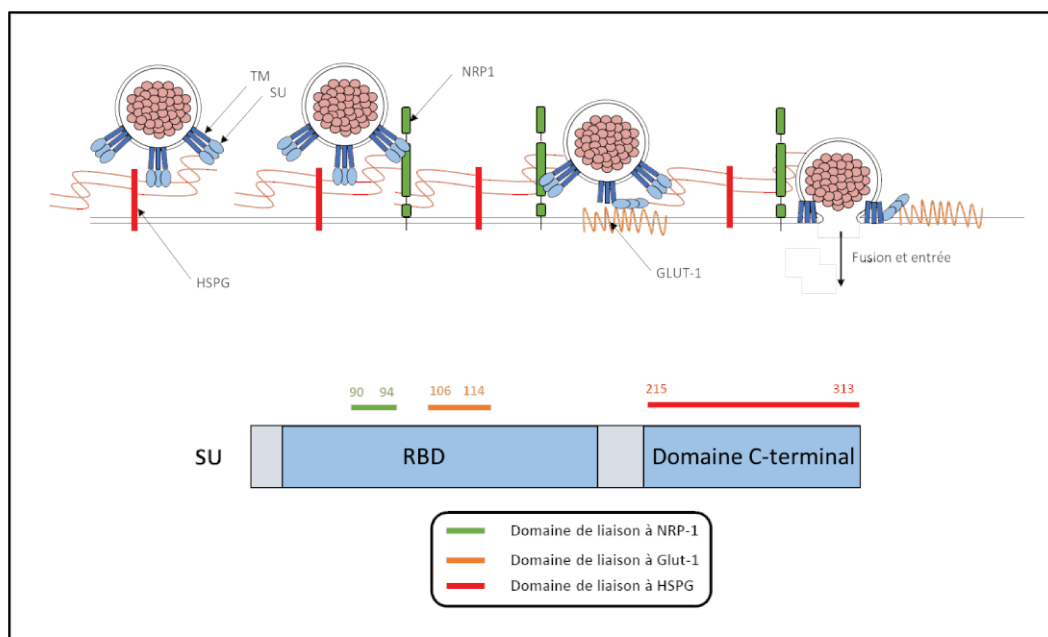
## 2.4. Tropisme cellulaire

In vivo, l'ADN proviral de HTLV-1 est principalement retrouvé dans les lymphocytes T CD4+ (Richardson et al., 1990). Le génome proviral est également retrouvé, en moindre mesure, dans d'autres types cellulaires, comprenant notamment les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes B, les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes ou encore les cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse (Koyanagi et al., 1993 ; Macatonia et al., 1992 ; Hishizawa et al., 2004 ; Pour revue : Rizkallah et al., 2015 ; Rodrigues et al., 2018). Chez des individus asymptomatiques ou des patients HAM/TSP, des sites d'intégrations identiques sont retrouvés dans les neutrophiles, monocytes, lymphocytes B, lymphocytes T CD4+ et CD8+, suggérant que le virus est également capable d'infecter les cellules souches hématopoïétiques in vivo (Furuta et al., 2017), qui se sont ensuite différenciées en diverses populations immunitaires. Ceci pourrait notamment justifier pourquoi certaines cellules, qui apparaissent comme résistantes à l'infection par HTLV-1 in vitro, tels que les monocytes (Sze et al., 2013), présentent de l'ADN viral intégré in vivo.

## 2.5. Cycle viral

L'infection d'une cellule par un virion enveloppé démarre par l'étape de reconnaissance de la protéine d'enveloppe à son/ses récepteur(s), suivie par l'étape de fusion de la membrane virale avec la membrane plasmique. Trois molécules ont été mises en évidence dans l'entrée des particules virales de HTLV-1 dans les lymphocytes T : les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPGs) (Jones et al., 2005), la neuropiline-1 (NRP-1) (Ghez et al., 2006) et le transporteur de glucose de type 1 (GLUT-1) (Manel et al., 2003). Les molécules GLUT-1 et HSPGs sont exprimées à la surface de nombreuses populations cellulaires chez les mammifères, au contraire de NRP-1 qui est exprimé à la surface des cellules endothéliales, des cellules dendritiques et des lymphocytes T activés. Cependant, NRP-1 est également exprimée par de nombreuses

lignées cellulaires transformées (Ghez et al., 2006). Ainsi, si la protéine d'enveloppe SU de HTLV-1 peut se fixer à de nombreuses lignées cellulaires in vitro (Jassal et al., 2001), le tropisme de HTLV-1 in vivo est quant à lui limité à certaines populations cellulaires, ce qui peut soit être le reflet de l'expression limitée de NRP-1 au contraire de GLUT-1 et HSPGs, soit être associé à des mécanismes d'inhibition de l'infection qui interviendraient après l'entrée virale. L'interaction de la protéine d'enveloppe de HTLV-1 avec ces trois récepteurs, probablement séquentielle, a été proposée selon le modèle suivant (Pour revue : Jones et al., 2011). Il y a d'abord une première interaction entre SU par son extrémité C-terminale et les HSPGs, ce qui permet la concentration des particules virales à la surface de la cellule, puis la formation d'un complexe ternaire entre les HSPGs, NRP-1 et SU. SU interagit avec NRP-1 par l'intermédiaire des acides aminés en positions 90 à 94 de son domaine RBD (Receptor Binding Domain). Cette interaction à NRP-1 entraîne un changement conformationnel de SU lui permettant alors de se fixer à GLUT-1 (via une autre région du RBD comprenant les acides aminés 106 et 114), avant d'amorcer le processus de fusion via le domaine transmembranaire (TM) de la protéine d'enveloppe (Figure 4).



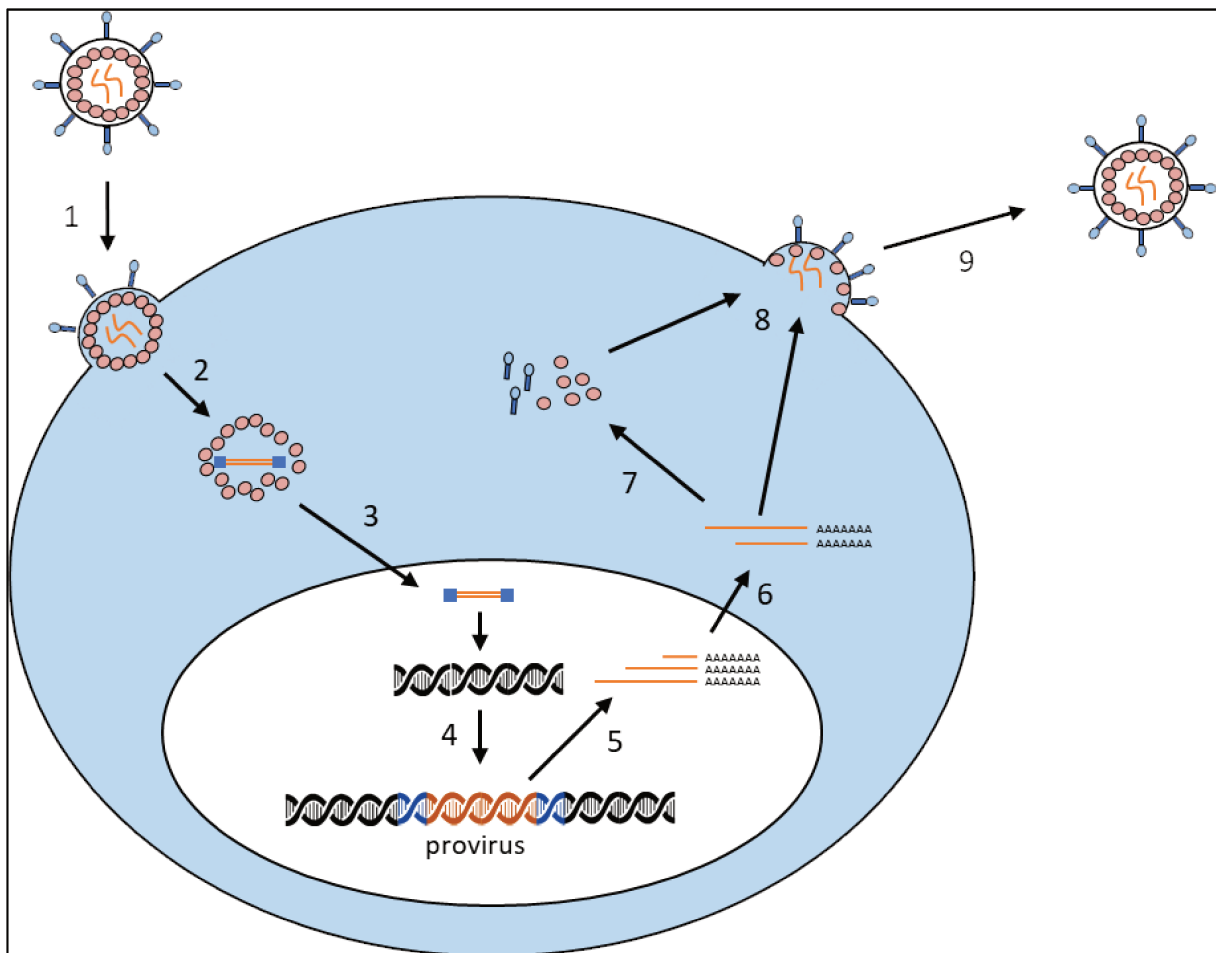
**Figure 4 :** Étapes de l'entrée virale (en haut) et domaines d'interaction entre SU et les récepteurs de HTLV-1 (en bas). Les protéines d'enveloppe de la particule virale de HTLV-1 fixent dans un premier temps les HSPGs via leur domaine de surface (SU). Cette fixation permet le rapprochement de SU avec NRP-1. SU peut alors fixer GLUT-1, ce qui modifie sa conformation et libère le domaine transmembranaire (TM) qui assure la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique. La capside virale est alors libérée dans le cytoplasme. SU interagit avec NRP-1 et GLUT-1 via son domaine RBD, impliquant respectivement les acides aminés 90 à 94 et 106 et 114 de SU. SU interagit avec les HSPGs via son domaine C-terminal. **Adapté de Lambert et al., 2012.**

Le modèle d'entrée décrit ci-dessus s'avère cohérent en ce qui concerne les lymphocytes T CD4+ et les cellules dendritiques (Ghez et al., 2006 ; Jones et al., 2005 ; Manel et al., 2003 ; Jin et al., 2006 ; Lambert et al., 2009 ; Jain et al., 2009). La molécule DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) joue un rôle prépondérant dans la fixation et l'entrée des particules virales de HTLV-1 dans les cellules dendritiques (Jain et al., 2009), ce qui suggère que le modèle d'entrée de HTLV-1 peut également faire intervenir d'autres acteurs moléculaires en fonction du sous-type cellulaire.

Plusieurs étapes qui composent le cycle viral de HTLV-1 n'ont pas été directement montrées, mais suggérées à partir d'études menées sur d'autres rétrovirus, tels que HIV-1 (Pour revue : Martin et al., 2016). Après le processus de fusion membranaire, la capsid virale des rétrovirus est libérée dans le cytoplasme et l'ARN viral est rétrotranscrit en ADN double brin lors du transfert de la capsid vers le noyau. Si la rétrotranscription de HIV-1 se fait en parallèle du processus de décapsidation (Hulme et al., 2011), ceci n'a pas été investigué en ce qui concerne HTLV-1. Une fois dans le noyau, l'ADN viral est inséré par l'intermédiaire de l'intégrase virale à l'intérieur du génome de l'hôte, cet ADN viral intégré portant également le nom de provirus. Le site d'intégration de HTLV-1 est aléatoire et ne semble pas reposer sur des régions chromosomiques préférentielles (Cook et al., 2014). Il a été initialement suggéré que la transcription basale du provirus par la machinerie transcriptionnelle de l'hôte permet la synthèse de la protéine Tax, nécessaire à l'expression efficace de l'ensemble des gènes viraux et qui n'est pas présente dans la particule virale. La protéine Tax peut reconnaître les LTRs du provirus pour renforcer la transcription des gènes viraux via le recrutement du facteur transcriptionnel CREB et des coactivateurs transcriptionnels CBP/p300 et P/CAF (p300/CBP-Associated Factor) (Harrod et al., 2000). Les différents ARNm produits via l'activité transactivatrice de Tax seront véhiculés dans le cytoplasme par l'intermédiaire de Rex avant d'être traduits par la machinerie ribosomique pour produire les différentes protéines structurales du virus (Env, Gag, Gag-Pro, Gag-Pro-Pol). L'ARNm viral non épissé correspond également à l'ARN génomique du virus. Les protéines Gag monomériques migrent alors à la membrane plasmique où elles multimérisent pour former les particules virales (Fogarty et al., 2011). Le mécanisme de recrutement de l'ARN génomique du virus à la membrane plasmique n'est pas clair mais repose probablement sur une diffusion passive de cet ARN vers la membrane plasmique ou une interaction préalable avec les protéines Gag dans le cytoplasme. Les protéines d'enveloppe, avant d'être adressées à la membrane, circulent à travers le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, où elles sont les cibles d'évènements de glycosylations (Pour revue :



Delamarre et al., 1996). Lors du bourgeonnement viral ou rapidement après, la protéine Gag est clivée en trois protéines via l'activité de la protéase virale : la protéine de matrice (MA), la protéine de capsid (CA) et la protéine de nucléocapside (NC). Cet événement de maturation est nécessaire pour la production de particules infectieuses chez les rétrovirus (Le Blanc et al., 2001) (Figure 5).



**Figure 5** : Cycle viral de HTLV-1. 1) Le virus reconnaît son récepteur et après fusion membranaire, la capsid pénètre dans le cytoplasme. 2) La capsid se désolidarise et le processus de rétrotranscription produit un ADN viral double brin. 3-4) Cet ADN viral double brin rentre dans le noyau et est intégré, par l'intermédiaire de l'intégrase virale, dans le génome de l'hôte. On parle alors de provirus. 5-6) Des ARNm du virus sont transcrits à partir des LTRs et sont exportés du noyau vers le cytoplasme. 7) Les protéines virales sont synthétisées à partir des ARNm viraux. 8) L'ARN viral non épissé et les protéines virales s'accumulent à la membrane plasmique et s'assemblent pour former une nouvelle particule virale. 9) La particule virale bourgeonne de la cellule infectée, est relâchée dans le milieu extracellulaire, et subit un processus de maturation. **Adapté de Martin et al., 2016.**

## **2.6. Transmission intercellulaire du virus**

### **2.6.1. Transmission par le virus libre**

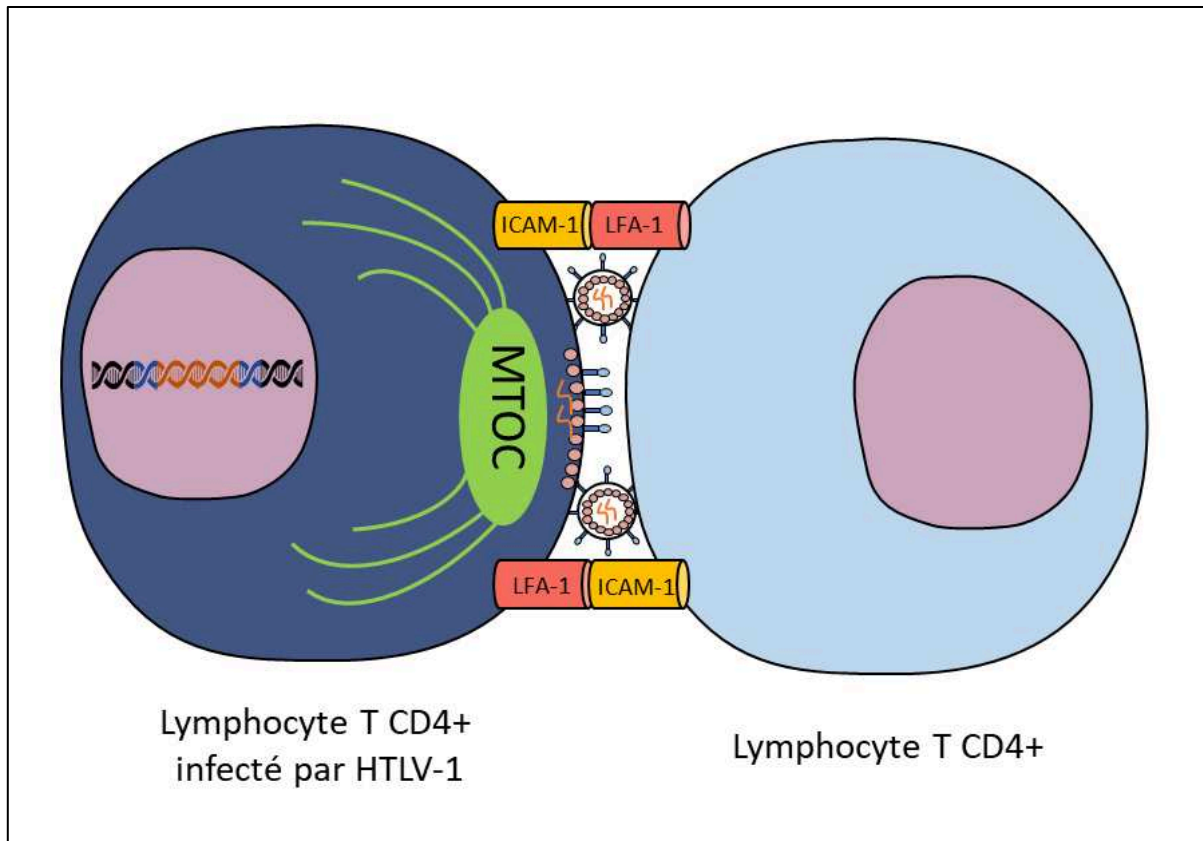
Bien que des particules virales de HTLV-1 soient produites *in vitro* par des cellules infectées, ces dernières sont peu infectieuses. D'une part, les particules virales de HTLV-1 ont une demi-vie courte, notamment due à un manque de stabilité de la protéine d'enveloppe de HTLV-1 (Li et al., 2008 ; Shinagawa et al., 2012), ce qui diminuerait de fait la capacité d'entrée des virions dans les cellules cibles. D'autre part, des virus HTLV-1 pseudotypés avec l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) sont moins infectieux que des virus HIV-1 pseudotypés avec la même enveloppe (Derse et al., 2001). Ces différents éléments démontrent que les particules virales de HTLV-1 sont peu infectieuses, non seulement à cause de la protéine d'enveloppe, mais également à cause de propriétés intrinsèques de la particule virale elle-même ou de phénomènes qui suivent l'entrée du virus. De plus, la transfusion de plasma issu de patients infectés par HTLV-1 n'induit aucune séroconversion du receveur (Donegan et al., 1994). Cette observation ne reflète pas uniquement la faible capacité infectieuse des particules virales de HTLV-1, mais également leur très faible concentration dans le plasma des individus infectés (Demontis et al., 2015). Ceci suggère donc qu'un autre mécanisme de transmission virale doit avoir lieu *in vivo* pour assurer la dissémination virale. La transmission efficace du virus HTLV-1 nécessite en effet un contact entre une cellule infectée et une cellule non infectée (Pour revue : Pique and Jones, 2012 ; Pour revue : Gross and Thoma-Kress, 2016). Ce mode de transmission viral, également décrit pour d'autres virus, augmente leur potentiel infectieux. Par exemple, l'infection d'une cellule après un contact avec une cellule infectée par HIV-1 est 100 à 1 000 fois supérieure en comparaison de l'infection par le virus libre (Dimitrov et al., 1993). Si une autre étude n'observe qu'une amélioration légère de la transmission de HIV-1 par le contact cellule-cellule (Mazurov et al., 2010), elle observe en revanche que dans le contexte de HTLV-1, l'efficacité d'infection par un contact avec une cellule infectée est 10 000 fois supérieure en comparaison de l'infection par le virus libre.

### **2.6.2. Transmission par le contact cellule-cellule**

*In vitro*, trois mécanismes décrivent la transmission de HTLV-1 d'une cellule infectée à une cellule non infectée par un contact entre deux cellules : la synapse virale (Igakura et al., 2003), les conduits cellulaires (Van Prooyen et al., 2010) et le biofilm viral (Pais-Correia et al., 2010).

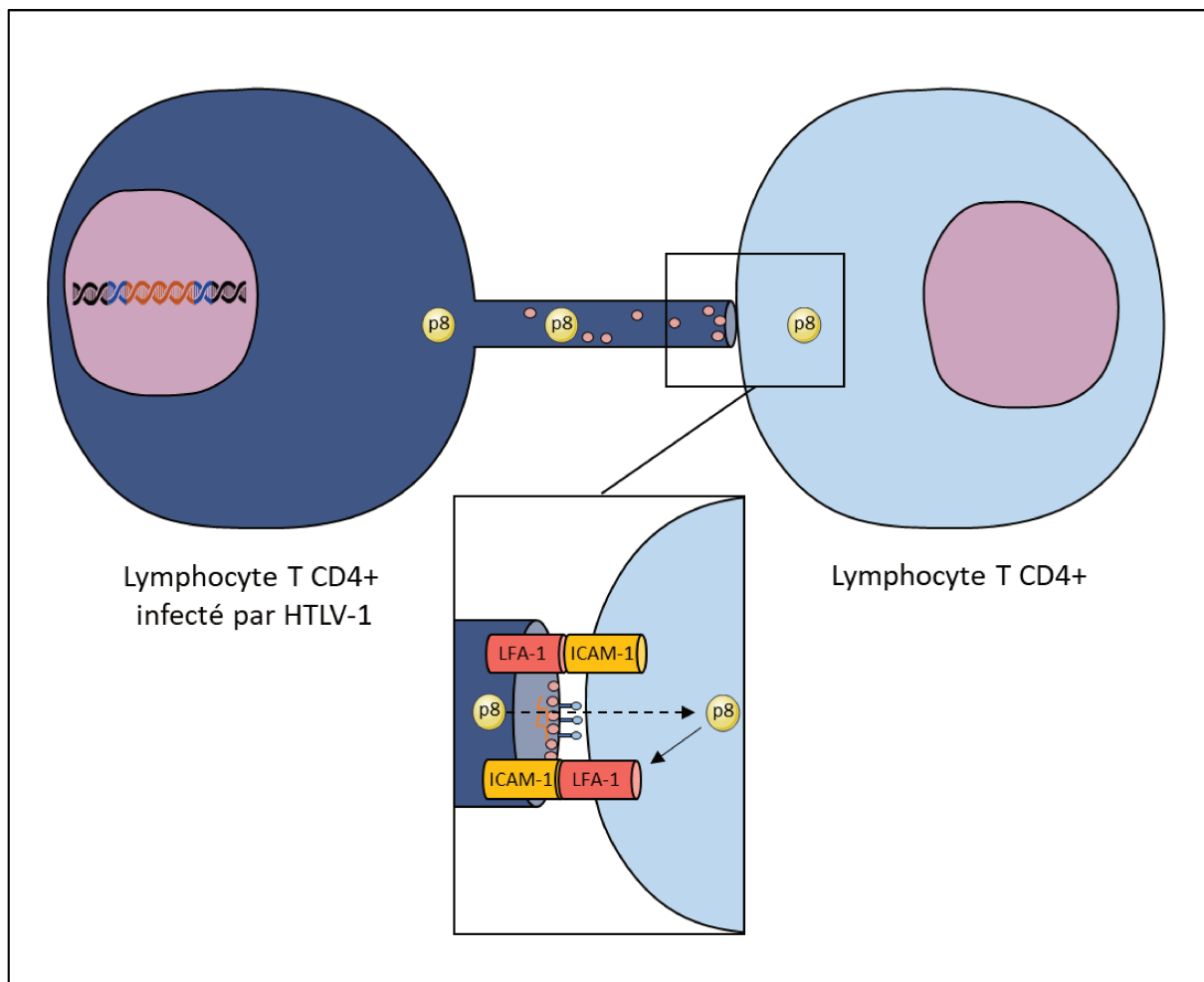
Ces trois mécanismes de transmission virale ne sont pas exclusifs et opèrent probablement ensemble pour augmenter l'efficacité d'infection d'une cellule cible.

La synapse virale est définie comme un espace où les particules virales bourgeonnent et se concentrent à proximité de la membrane plasmique de la cellule non infectée (Igakura et al., 2003) (**Figure 6**). Les protéines Gag et Env, ainsi que l'ARN viral de HTLV-1, se concentrent au niveau du site de contact, avant d'être transférés dans la cellule cible. Une repolarisation du centre organisateur des microtubules (MTOC) vers la synapse virale a lieu dans les cellules infectées. L'inhibition de la polymérisation des microtubules bloque la polarisation des protéines Gag, ainsi que leur transfert dans la cellule cible, ce qui témoigne de l'importance du cytosquelette de microtubules dans le mécanisme de transmission via la synapse virale. Par ailleurs, la polymérisation et dépolymérisation de l'actine est également un élément nécessaire pour assurer la transmission du virus via le contact cellulaire (Mazurov et al., 2010). La repolarisation du MTOC est médiée par l'expression concomitante de Tax et l'activation du récepteur ICAM-1 (Nejmeddine et al., 2005). Tax favorise l'expression de ICAM-1 (Tanaka et al., 1995), ce dernier favorisant la formation du contact entre deux lymphocytes en fixant le récepteur LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen 1) sur la cellule non infectée. De plus, p8 participe aussi à la formation de la synapse virale puisqu'il est capable d'accumuler la protéine LFA-1 à la surface de la cellule infectée. Bien que l'interaction ICAM-1/LFA-1 et la polarisation du MTOC soient des éléments communs entre la synapse virale et la synapse immunologique, la synapse virale ne correspond pas à une reprogrammation de la synapse immunologique. En effet, la synapse immunologique, au contraire de la synapse virale, nécessite l'interaction entre le TCR (T-cell Receptor) et le CMH, dure plus longtemps et nécessite la polarisation du MTOC dans la cellule cible (Pour revue : Vasiliver-Shamis et al., 2010). En plus d'induire l'expression d'ICAM-1, Tax contribue également à l'expression d'autres protéines, comme Gem et Fascin, qui favorisent le remodelage des filaments d'actines (Chevalier et al., 2014 ; Gross et al., 2016). La protéine Gem est impliquée dans la mobilité spontanée, la migration des cellules et la formation de conjugués cellule-cellule (Chevalier et al., 2014), tandis que la protéine Fascin participe au relâchement des particules virales et à la transmission du virus en système cellule-cellule (Gross et al., 2016).



**Figure 6 :** Transmission de HTLV-1 par l'intermédiaire de la synapse virale. La polarisation du MTOC dans la cellule infectée et l'interaction entre les protéines ICAM-1 et LFA-1 favorisent la mise en place de la synapse virale. Les particules virales bourgeonnent dans la fente synaptique, ce qui permet leur concentration à proximité de la cellule non infectée. **Adapté de Gross and Thoma-Kress, 2016.**

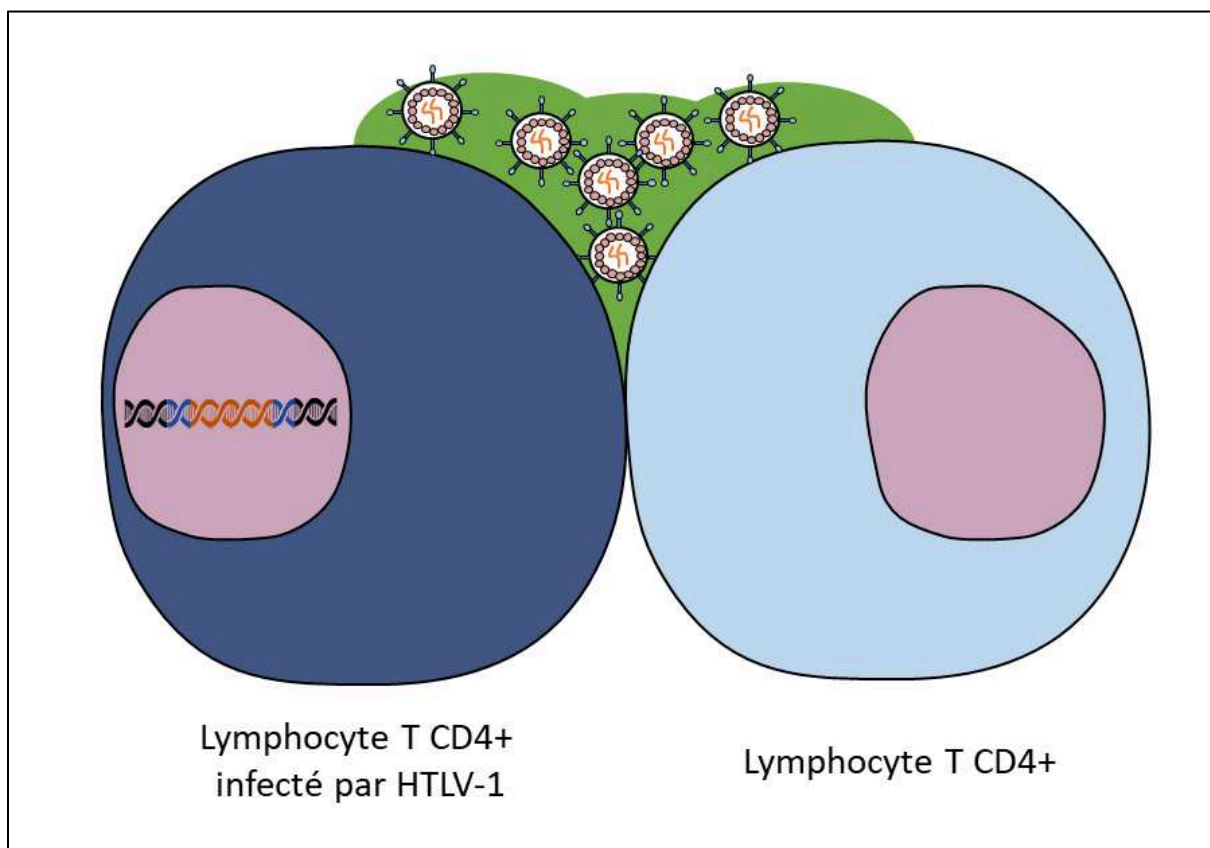
HTLV-1 peut aussi être transmis d'une cellule infectée à une cellule non-infectée par l'intermédiaire de protrusions membranaires nommées conduits cellulaires (Van Prooyen et al., 2010) (Figure 7). Des particules virales de HTLV-1 sont présentes aux sites de contact entre deux conduits ou entre un conduit et un lymphocyte T non infecté et le transfert de la protéine Gag par l'intermédiaire de ces conduits a également été observé. L'expression de la protéine p8 de HTLV-1 augmente le nombre et la longueur de ces conduits cellulaires. La protéine p8 elle-même peut emprunter ces conduits cellulaires pour modifier le comportement de la cellule cible, afin de limiter l'activation du TCR ou de renforcer les contacts cellulaires via l'agrégation des protéines LFA-1 à la surface de la cellule. Enfin, p8 contribue à la mise en place de polysynapses, c'est-à-dire plusieurs synapses virales entre une même cellule infectée et plusieurs cellules non infectées, ce qui contribue à une meilleure dissémination virale.



**Figure 7** : Transmission de HTLV-1 par l'intermédiaire du conduit cellulaire. La jonction entre les deux cellules formerait une synapse virale dans laquelle les particules virales peuvent bourgeonner. La protéine p8 peut être véhiculée dans la cellule non infectée via ce conduit cellulaire et contribuer à la formation de la synapse via l'agrégation des protéines LFA-1 à la surface de la cellule non infectée. **Adapté de Gross and Thoma-Kress, 2016.**

Le biofilm viral correspond à des particules virales de HTLV-1 qui se concentrent à la surface des lymphocytes T infectés, au sein de structures riches en carbohydrates (Pais-Correia et al., 2010) (**Figure 8**). Elles colocalisent ainsi avec des composants de la matrice extracellulaire comme le collagène ou l'agrine, ou bien d'autres molécules membranaires comme la tétherine ou la galectine-3. Le biofilm viral est observable sur des lignées lymphocytaires transformées par HTLV-1 et des lymphocytes d'individus asymptomatiques ou de patients HAM/TSP mis en culture *in vitro*. Le transfert de cette structure d'une cellule infectée à une cellule non infectée a lieu après un contact physique et se déroule majoritairement en dehors de la zone de contact direct entre les deux cellules, ce qui suggère que le biofilm viral ne correspond pas simplement au matériel infectieux transféré lors de l'établissement de la synapse virale. Le détachement

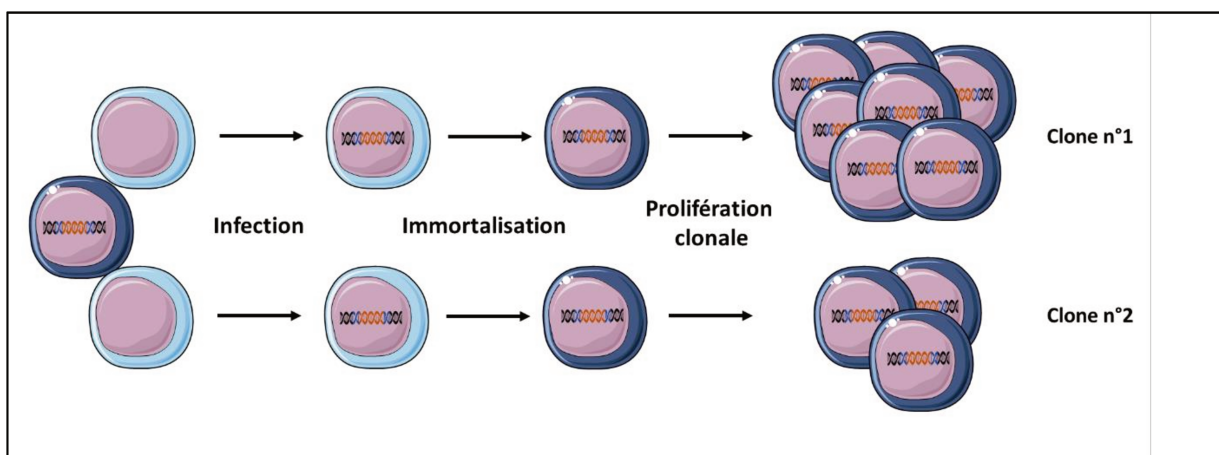
mécanique du biofilm viral par des lavages répétés des cellules infectées par HTLV-1 induit une diminution de leur capacité infectieuse. Le biofilm viral obtenu après détachement mécanique s'avère également plus infectieux que des particules virales de HTLV-1 concentrées (Alais et al., 2015). Il est possible que les protéines de la matrice extracellulaire contenues dans le biofilm viral favorisent l'adhésion des particules virales sur une cellule cible. En plus d'avoir une fonction dans la transmission virale, il a été proposé que le biofilm viral contribue également à la protection du virus en surface à la réponse immunitaire humorale, puisque celui-ci est véritablement enchâssé dans une région riche en carbohydrates qui pourraient physiquement masquer les épitopes viraux.



**Figure 8** : Transmission de HTLV-1 par l'intermédiaire du biofilm viral. Les particules virales de HTLV-1 sont retenues à la membrane plasmique de la cellule infectée et enchâssées dans une gaine de protéines de la matrice extracellulaire. La diffusion du biofilm viral vers une cellule non infectée peut se faire lors d'un contact cellule-cellule. **Adapté de Gross and Thoma-Kress, 2016.**

## 2.7. Dissémination virale

La dissémination de HTLV-1 dans l'organisme infecté est orchestrée par deux procédés : la néoinfection, dont les mécanismes sont décrits ci-dessus, et la division mitotique des cellules infectées (Wattel et al., 1995). Cette amplification du nombre de cellules infectées via le processus de mitose est aussi qualifiée d'expansion clonale, un clone étant défini comme un ensemble de cellules sœurs possédant le même site d'intégration proviral. Le nombre de clones différents résulte quant à lui des événements de néoinfection, puisque le site d'intégration du provirus est stochastique (Cook et al., 2014) (Figure 9).



**Figure 9** : Étapes de dissémination du virus HTLV-1 dans l'organisme. La néoinfection de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> génère un certain nombre de cellules infectées avec des sites d'intégration différents. L'expression des protéines virales, dont Tax, assure le processus d'immortalisation cellulaire, ce qui permet à la cellule de proliférer de manière continue. Différents clones de différentes tailles seront ainsi obtenus. Un clone se définit par un ensemble de cellules sœurs avec un site d'intégration commun.

Le génome de HTLV-1 présente très peu de variations nucléotidiques entre différents individus infectés présents au sein d'une même région géographique ou au sein d'un même individu au cours de l'infection (Gessain et al., 1992), ce qui suggère que le mécanisme de dissémination viral résulte principalement de divisions mitotiques, d'autant que l'ADN polymérase cellulaire est plus fidèle que la transcriptase inverse du virus (Mansky, 2000). De plus, il a été observé que le traitement de patients HAM/TSP avec de la zidovudine (ou AZT pour azidothymidine), un inhibiteur de la transcriptase inverse de HIV-1, qui pourtant est capable de limiter la néoinfection par HTLV-1 in vitro (Macchi et al., 1997 ; Cachat et al., 2013), ne modifie pas la charge provirale in vivo (Taylor et al., 2006), corroborant ainsi le fait que la réplication de

HTLV-1 est principalement liée à des divisions mitotiques. Cependant, il est également possible que la zidovudine n'ait pas eu d'effet *in vivo* dans cette étude (Taylor et al., 2006). Il a notamment été montré que la concentration optimale d'AZT nécessaire pour inhiber l'infection par un contact cellulaire est plus élevée que la concentration optimale pour inhiber l'infection par un virus libre dans le cadre de HIV-1 (Agosto et al., 2014). De plus, il est également possible que les événements de néoinfection soient localisés dans des niches spécifiques de l'organisme, tel que les organes lymphoïdes, où l'accès aux antiviraux en concentration suffisante est souvent limité (Lorenzo-Redondo et al., 2016). Une étude a estimé que chez les individus infectés par HTLV-1, de nouveaux clones pouvaient apparaître au cours de l'infection, et que ceux-ci contribuaient en moyenne à 20 % de la charge provirale à un instant *t*, ce qui montre certes que la majorité de la charge provirale est définie par l'expansion de clones préexistants, mais que des événements de néoinfection ont également lieu *in vivo* (Gillet et al., 2011). Cette idée a longtemps été occultée à cause de l'absence d'expression de Tax dans les cellules immédiatement isolées à partir du sang d'individus infectés (Pour revue : Kulkarni and Bangham, 2018). Cependant, les individus infectés présentent une réponse cytotoxique dirigée contre Tax qui est maintenue, ce qui suggère une expression de Tax dans l'organisme, probablement en dehors de la circulation sanguine. De manière intéressante, l'expression du gène *tax* est plus élevée dans les organes lymphoïdes secondaires en comparaison du sang, dans un modèle de souris inoculées avec des cellules de patients ATLL (Suzuki et al., 2012). Ainsi, ceci suggère une potentielle expression des protéines virales et une potentielle production de particules virales dans les organes lymphoïdes des individus infectés.

Indépendamment du mécanisme qui participe à la réplication du virus dans l'organisme, l'élévation de la charge provirale, c'est-à-dire la fréquence des cellules contenant une intégration du provirus parmi les PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) totaux, est couramment associée au développement des symptomatologies viro-induites (Pour revue : Bangham et al., 2014). Les individus chroniquement infectés présentent de nombreux clones dont les abondances relatives, c'est-à-dire le nombre de cellules sœurs dans chaque clone, sont variables. Le mécanisme qui régit l'expansion de ces différents clones est peu compris. Tandis que le développement de l'ATLL chez un individu est associé à la prolifération maligne d'un clone minoritaire qui devient ensuite majoritaire, le développement de l'HAM/TSP n'est pas nécessairement associé à une expansion oligoclonale (Uchiyama et al., 1977 ; Pour revue : Bangham et al., 2014). Ainsi, d'autres mécanismes doivent intervenir dans le développement

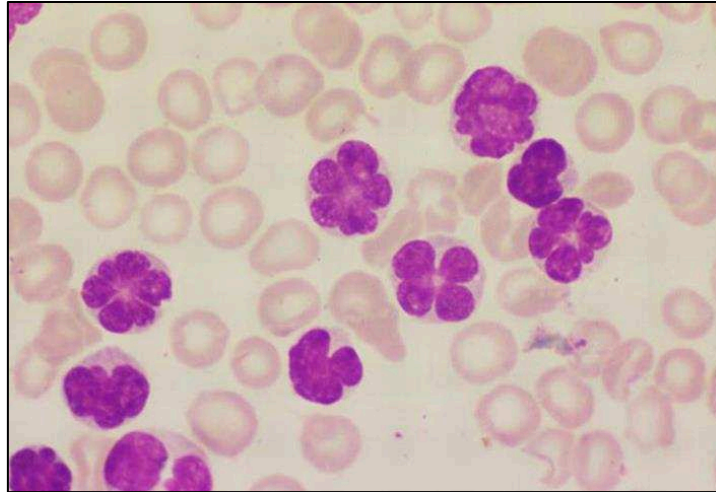


de ces deux maladies, comme le mode de transmission viral, la charge provirale au moment de l'infection ou des dérégulations de la réponse immunitaire.

## 2.8. Symptômes et traitements

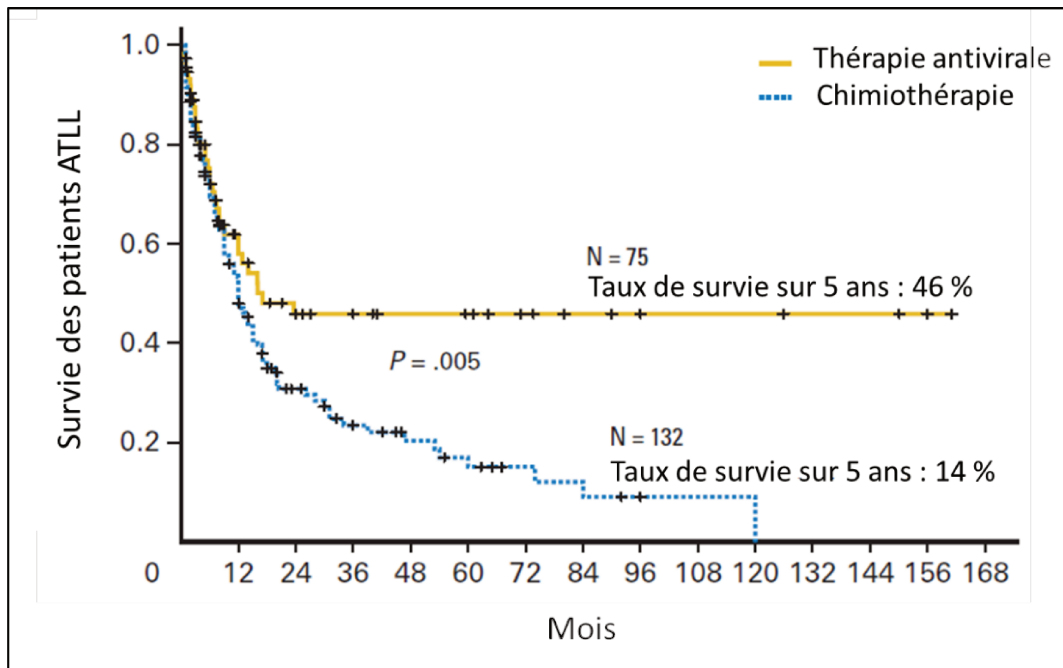
### 2.8.1. ATLL

L'ATLL, décrite avant même la découverte de HTLV-1 (Uchiyama et al., 1977) est une lymphoprolifération maligne des lymphocytes T CD4+ qui apparaît généralement au terme d'une longue période d'infection par HTLV-1. L'ATLL peut se diviser en quatre sous-types cliniques : la forme aiguë, la forme chronique, la forme indolente et la forme lymphomateuse (Shimoyama, 1991). Les formes aiguë et lymphomateuse, qui représentent à elles seules 80 % des ATLL (Pour revue : Mehta-Shah et al., 2017), sont les plus agressives avec une médiane de survie d'environ 9.5 mois (Katsuya et al., 2015), contre 43 mois pour les formes chroniques et indolentes. Ces valeurs tiennent compte d'un traitement chimiothérapeutique des patients. Différents paramètres cliniques permettent de différencier les sous-types d'ATLL : le nombre de lymphocytes T circulants, le pourcentage de lymphocytes T anormaux, le niveau de lactate déshydrogénase dans le sang, la calcémie, la taille des ganglions lymphatiques ainsi que la présence ou non de lésions tumorales dans les différents organes (Shimoyama, 1991). Les symptômes quant à eux sont assez nombreux et dépendent du sous-type d'ATLL. Ils peuvent aller de simples toux, fièvres ou douleurs abdominales à des jaunisses, épanchements du liquide pleural ou intra-abdominal voire des états d'inconscience. Les cellules leucémiques possèdent un noyau multilobé en forme de fleur (Uchiyama et al., 1977) (**Figure 10**). Leur phénotype est caractérisé par l'expression des récepteurs CD2, CD3, CD4, CD5, CD25, CCR4 (CC chemokine Receptor 4), CADM1 (Cell Adhesion Molecule 1) (Dahmouh et al., 2002 ; Yoshie et al., 2002 ; Sasaki et al., 2005). D'autres récepteurs peuvent servir de biomarqueur de la pathogenèse puisque la perte d'expression de CD7 à la surface des cellules infectées est associée à la progression vers l'ATLL tandis que l'expression de CCR7, toujours à la surface des cellules infectées, est associée aux formes agressives de l'ATLL (formes aiguë et lymphomateuse) (Kagdi et al., 2017).



**Figure 10** : Observation au microscope de cellules leucémiques dans le sang d'un patient avec un ATLL. Ces cellules sont caractérisées par un noyau en forme de fleur. Issu de « **Flower cells of leukemia** », **Blood 115, 2010**.

Depuis 1978 au Japon, plusieurs essais cliniques d'un traitement chimiothérapeutique de l'ATLL ont permis de mettre en place et d'optimiser le traitement des patients. Le traitement chimiothérapeutique VCAP-AMP-VECP (VCAP pour vincristine, cyclophosphamide, doxorubicine, prédnisone) (AMP pour doxorubicine, ranimustine, prédnisone) (VECP pour vindésine, étoposide, carboplatine, prédnisone), mis au point une vingtaine d'années plus tard, semble être plus efficace que le traitement chimiothérapeutique CHOP (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prédnisone) initialement utilisé, avec un taux de rémission de 40 % contre 25 % et une amélioration de la survie des patients sur une durée de 3 ans (Tsukasaki et al., 2007). Cependant, une étude longitudinale ultérieure et réalisée sur une plus grande cohorte indique que les deux traitements chimiothérapeutiques s'équivalent (Katsuya et al., 2015). La transplantation de cellules souches hématopoïétiques reste une alternative plus efficace que la chimiothérapie, mais également plus difficile à mettre en œuvre, notamment sur les personnes réfractaires à la chimiothérapie. Pour pallier les faibles résultats obtenus avec la chimiothérapie, des thérapies antivirales ont également été mises en place. Un traitement combiné de zidovudine avec de l'IFN- $\alpha$  a montré des cas de rémissions partielles ou complètes à plusieurs reprises (Gill et al., 1995 ; Matutes et al., 2001 ; Hermine et al., 2002). Une étude longitudinale a observé que ce traitement antiviral est notamment plus efficace que la chimiothérapie, avec un taux de survie des patients sur 5 ans de 46 % contre 20 %, respectivement (Bazarbachi et al., 2010) (Figure 11). En revanche, la chimiothérapie reste plus efficace que le traitement antiviral pour la forme lymphomateuse de l'ATLL (Bazarbachi et al., 2010).



**Figure 11** : Taux de survie sur 5 ans des patients ATLL qui suivent un traitement chimiothérapeutique ou antiviral (AZT + IFN- $\alpha$ ). Adapté de Bazarbachi et al., 2010.

L'addition d'arsenic à la combinaison de l'IFN- $\alpha$  et de la zidovudine a été également envisagé puisqu'in vitro, cette molécule est capable d'inhiber la prolifération des cellules infectées par HTLV-1 (Bazarbachi et al., 1999). L'arsenic, dont les fonctions sont en synergie avec l'IFN- $\alpha$ , induit l'apoptose des cellules infectées, notamment via la dégradation de Tax par le protéasome (El-Sabban et al., 2000 ; Mahieux et al., 2001 ; Nasr et al., 2003). Bien qu'un traitement combiné de zidovudine, d'IFN- $\alpha$  et d'arsenic dans un essai clinique de phase II se soit avéré très prometteur et non toxique, avec un taux de rémission de 100 % (comprenant les rémissions totales et partielles) (Kchour et al., 2009), une étude de l'efficacité de ce traitement sur une large cohorte de patients, avec notamment l'objectif d'analyser l'effet additif de l'arsenic, reste nécessaire afin d'évaluer son importance pour une utilisation standardisée. Outre la chimiothérapie et le traitement antiviral, des immunothérapies ont également été envisagées. Plus précisément, un anticorps monoclonal dirigé contre CCR4 (Mogamulizumab), un récepteur présent sur les cellules leucémiques des patients ATLL, induit notamment une forte réponse ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) envers ces dernières in vitro (Ishida et al., 2004). Le traitement de patients ATLL avec cet anticorps, combiné à une chimiothérapie, augmente le taux de rémission complète, comparé à la chimiothérapie seule (52 % vs 33 %) (Ishida et al., 2015).

### 2.8.2. HAM/TSP

L'association entre l'infection par HTLV-1 et le développement de l'HAM/TSP a été caractérisée pour la première fois dans les Caraïbes en 1985, où des individus diagnostiqués avec une TSP étaient également séropositifs pour HTLV-1 (Gessain et al., 1985). Peu après, une autre étude menée au Japon a fait le lien entre l'infection par HTLV-1 et le développement d'une myélopathie, nommée HAM (Osame et al., 1986). Ces deux maladies étant identiques, elles furent renommées HAM/TSP par la suite. L'HAM/TSP est caractérisée par une inflammation chronique du système nerveux central (SNC). Elle se manifeste cliniquement par une faiblesse musculaire des membres inférieurs voire une paralysie de ces derniers, mais aussi par des lombalgies et des troubles urinaires et fécaux. Ces symptômes sont associés à des dommages des tissus neuronaux, allant de la destruction des gaines de myéline à l'atrophie de la moelle épinière.

Au contraire de l'ATLL, pour laquelle les traitements mis en place visent à éliminer les cellules infectées de l'organisme, ou au minimum à réduire leur prolifération, le traitement actuel de l'HAM/TSP cible uniquement les manifestations cliniques. Le traitement classique correspond à de la prédnisolone, un glucocorticoïde utilisé comme anti-inflammatoire. Une étude longitudinale récente a observé que la prise continue de prédnisolone améliore les fonctions motrices des patients HAM/TSP (Coler-Reilly et al., 2017). D'autres solutions thérapeutiques ont également été étudiées dans le but d'éliminer le virus plutôt que de simplement traiter les symptômes. Il a été observé que le traitement combiné de prédnisolone, de valproate et d'IFN- $\alpha$  améliore les symptômes cliniques et réduit la charge provirale des patients HAM/TSP (Boostani et al., 2015). Une autre étude a mis en évidence que le traitement combiné de valproate et d'AZT réduit la charge provirale chez des babouins naturellement infectés par STLV-1 (Afonso et al., 2010). Le valproate inhibe l'activité des histones désacétylases, contribuant ainsi à une augmentation de l'expression des protéines virales de HTLV-1 dans les cellules infectées (Belrose et al., 2011), ce qui peut favoriser la lyse des cellules infectées par la réponse T cytotoxique. Enfin, plusieurs patients HAM/TSP ont également été traités avec un anticorps monoclonal anti-CCR4, ce qui a eu pour conséquence une réduction de la charge provirale, de la prolifération des cellules CCR4+ et de la production de cytokines pro-inflammatoires (Yamauchi et al., 2015).

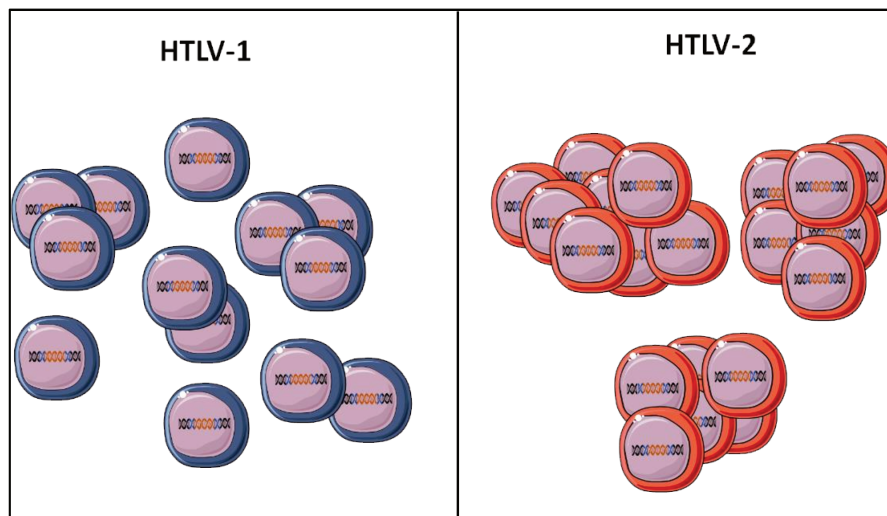
### 2.8.3. Autres maladies

Outre l'ATLL et l'HAM/TSP, d'autres maladies ont été associées à l'infection par HTLV-1. Parmi elles, on retrouve des maladies inflammatoires, telles que les uvéites, conjonctivites, dermatites infectieuses, arthrites, myosites, et des maladies auto-immunes, telles que le syndrome de Sjögren, la thyroïdite de Hashimoto ou encore la maladie de Basedow (Pour revue : Gonçalves et al., 2010). Le taux de prévalence et l'origine de ces diverses maladies sont peu connus, leur traitement se résumant souvent à la prise d'anti-inflammatoires. En plus de ces maladies, l'infection par HTLV-1 peut aussi faciliter les infections opportunistes par des bactéries, champignons ou parasites, qui seront traitées par des bactéricides, fongicides ou anti-helminthes, respectivement (Pour revue : Futsch et al., 2017).

### 2.9. Comparaison entre HTLV-1 et HTLV-2

La famille des virus HTLV comprend 4 virus génétiquement distincts, nommés HTLV-1 à 4, et qui présentent tous une origine simienne. Tandis que les infections par HTLV-3 et -4 sont épisodiques et associées à des morsures de primates chez des chasseurs d'Afrique centrale (Pour revue : Mahieux and Gessain, 2011), l'infection par HTLV-2 est endémique de plusieurs populations amérindiennes et de tribus de pygmées, mais également présente chez des consommateurs de drogues intraveineuses à travers le monde (Pour revue : Vrieling and Reesink, 2004). La transmission du virus HTLV-2 suit les mêmes modalités que celles de HTLV-1. Les deux virus partagent les récepteurs NRP-1 et GLUT-1, tandis que l'entrée du virus HTLV-2 dans les lymphocytes est indépendante de l'expression des HSPGs (Jones et al., 2006). Le tropisme des deux virus in vivo est différent puisque le tropisme préférentiel, sinon exclusif, de HTLV-2 correspond aux lymphocytes T CD8+ (Ijichi et al., 1992). Les lymphocytes T CD8+, en comparaison des lymphocytes T CD4+, présentent une expression réduite des HSPGs, ce qui pourrait justifier les tropismes préférentiels de HTLV-1 et HTLV-2, en raison de leur utilisation différentielle des HSPGs pour l'entrée virale (Jones et al., 2006). Cependant, in vivo, chez le lapin, les deux populations lymphocytaires (T CD4+ et T CD8+) sont susceptibles à l'infection par HTLV-1 ou HTLV-2 (Kannian et al., 2012). Le tropisme différentiel entre les deux virus proviendrait cependant de la capacité de HTLV-1 et HTLV-2 à immortaliser préférentiellement les lymphocytes T CD4+ ou CD8+, respectivement. L'expansion clonale diffère également entre les deux virus. Bien que le nombre de clones chez

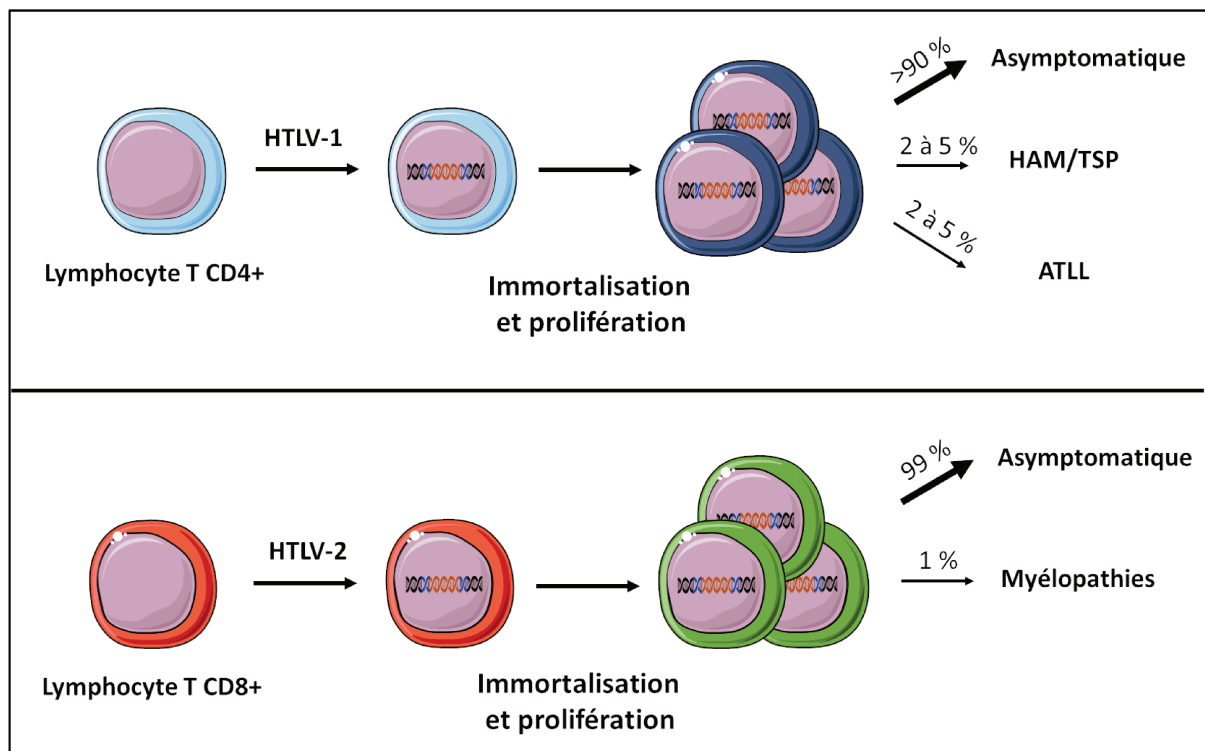
les individus infectés par HTLV-2 soit inférieur au nombre de clones chez les individus infectés par HTLV-1, leur prolifération est accentuée (Melamed et al., 2014) (**Figure 12**).



**Figure 12** : Divergences dans la fréquence et l'abondance des clones lors des infections par HTLV-1 et HTLV-2. In vivo, l'infection par HTLV-1 induit la génération de nombreux clones de lymphocytes T CD4+ au contraire de l'infection par HTLV-2, qui induit la génération d'un nombre de clones de lymphocytes T CD8+ plus réduit. À l'inverse, l'abondance relative de chaque clone est supérieure dans le contexte de l'infection par HTLV-2 en comparaison de HTLV-1.

Le génome de HTLV-2 présente environ 60 % d'homologie avec celui de HTLV-1 (Shimotohno et al., 1985). Bien que plusieurs protéines conservent des fonctions similaires entre les deux virus, des divergences de fonctions ont pu être observées entre les protéines homologues des deux virus, comme Tax-1 et Tax-2 ou HBZ et APH-2 (Antisens Protein of HTLV-2) par exemple (Pour revue : Ciminale et al., 2014). Si le virus HTLV-2 est capable d'immortaliser des lymphocytes in vitro, au même titre que HTLV-1 (Tarsis et al., 1998), Tax-2 présente cependant une meilleure capacité d'immortalisation des lymphocytes par rapport à Tax-1 (Imai et al., 2013). Si HBZ et APH-2 sont tous les deux capables d'inhiber l'activité transactivatrice de Tax (Pour revue : Ciminale et al., 2014), APH-2, au contraire de HBZ, a cependant un temps de demi-vie plus court (Dubuisson et al., 2018), et n'induit pas de prolifération cellulaire (Douceron et al., 2012). HTLV-2 a été caractérisé pour la première fois en 1982 chez un patient avec une leucémie à tricholeucocytes (Kalyanaraman et al., 1982). Cependant, les cellules leucémiques de ce patient n'étaient pas infectées par HTLV-2. Par ailleurs, l'infection par HTLV-2 n'a jamais été associée au développement de l'ATLL ou autres

formes de cancer. En revanche, l'infection par HTLV-2 a été associée dans de rares cas au développement de myélopathies (Pour revue : Vrieling and Reesink, 2004) (Figure 13).



**Figure 13** : Devenirs de l'infection par les virus HTLV-1 (en haut) et HTLV-2 (en bas). L'infection par HTLV-1 induit l'immortalisation et la prolifération des lymphocytes T CD4+. Si l'infection reste asymptomatique dans la majorité des cas, le développement de l'HAM/TSP ou de l'ATLL apparaît chez moins de 10 % des individus. L'infection par HTLV-2 conduit à l'immortalisation et la prolifération des lymphocytes T CD8+. L'infection par HTLV-2 est rarement symptomatique et repose sur le développement de myélopathies similaires à l'HAM/TSP.

Ces différences de symptomatologies, aussi bien qualitatives que quantitatives, font de HTLV-2 un bon outil d'étude pour comprendre les mécanismes d'induction des symptômes induit par HTLV-1. Avant cela, il reste néanmoins important de déterminer quels sont les événements moléculaires et cellulaires qui participent au développement de ces maladies viro-induites.

### 3. Le rôle de l'immunité dans le développement des maladies induites par HTLV-1

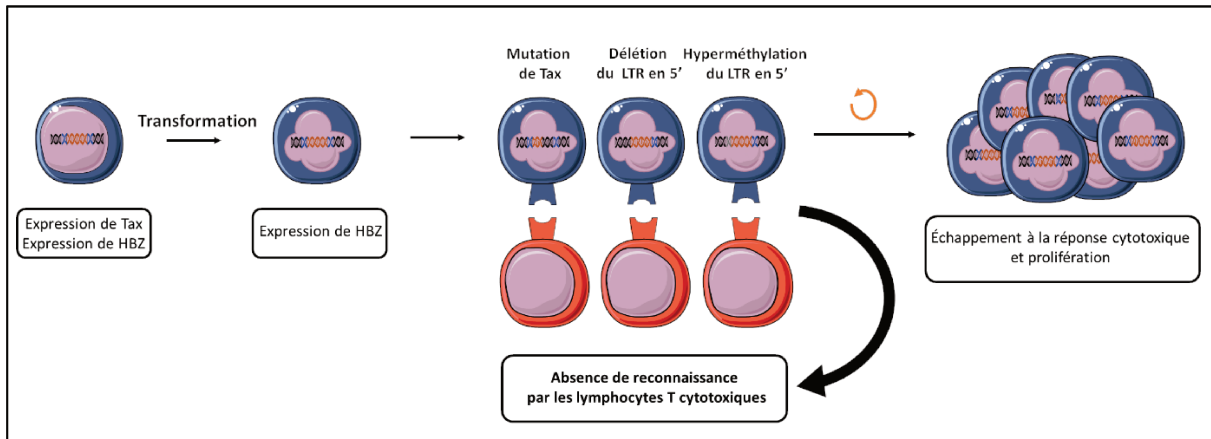
#### 3.1. ATLL

##### 3.1.1. Importance de Tax et HBZ dans l'immortalisation et la transformation des cellules infectées

Le développement de l'ATLL est caractérisé par la prolifération maligne d'un clone de cellules infectées par HTLV-1. L'expression des protéines virales Tax et HBZ affectent l'état de la cellule infectée puisque ces deux protéines sont impliquées dans les processus d'immortalisation et de transformation cellulaire, deux phénomènes clés dans l'oncogenèse. Tax, en favorisant la prolifération cellulaire et en inhibant l'apoptose, favorise l'immortalisation des cellules infectées. Tax inhibe également la machinerie de réparation de l'ADN, ce qui conditionne l'apparition d'erreurs génétiques dans les cellules infectées par HTLV-1 et dont l'accumulation favorise le processus de transformation cellulaire (Pour revue : Watanabe, 2017 ; Pour revue : Giam and Semmes, 2016). Les propriétés oncogènes de Tax ont été observées à plusieurs reprises. Tax est capable de transformer des fibroblastes murins in vitro (Matsumoto et al., 1997 ; Tanaka et al., 1990), l'inoculation de ces fibroblastes transformées induisant par ailleurs le développement de tumeurs dans des souris (Tanaka et al., 1990). In vivo, l'expression transgénique de Tax dans les thymocytes de souris suffit à induire le développement de leucémies ou lymphomes (Hasegawa et al., 2006). Une étude a cependant montré que l'expression de Tax seul ne suffit pas à transformer des lymphocytes T primaires humains (Bellon et al., 2010), au contraire de l'ensemble des protéines virales (Aboud et al., 1987), ce qui suggère l'intervention d'autres protéines virales dans le développement de l'ATLL, comme HBZ, dont l'expression dans des souris transgéniques (sous la dépendance du promoteur du gène CD4) peut conduire au développement de lymphomes (Mitagami et al., 2015). Si Tax et HBZ contribuent au développement de l'ATLL, Tax n'est pas impliqué dans la persistance et la prolifération des cellules leucémiques, au contraire de HBZ (Pour revue : Giam and Semmes, 2016). En effet, les cellules leucémiques issues des patients ATLL ont généralement une extinction de la transcription du brin sens de l'ADN proviral, codant la majorité des protéines virales, et présentent généralement une délétion ou une hyperméthylation du LTR en 5', voire des mutations dans le gène tax (Pour revue : Watanabe, 2017 ; Takeda et al., 2004). Au contraire, la transcription du gène hbx, dépendante de la transcription à partir du LTR en 3', est maintenue dans les cellules leucémiques (Figure 14) (Satou et al., 2006). HBZ,



en plus d'inhiber la transcription des gènes viraux, contribuant ainsi à l'échappement aux lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) dirigés contre les protéines virales, assure la prolifération des cellules leucémiques et inhibe leur apoptose. En plus de mécanismes strictement virologiques, des dérèglements de la réponse immunitaire peuvent favoriser le développement de l'ATLL, notamment via l'induction des cytokines immunosuppressives IL-10 (Interleukine-10) et TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ).



**Figure 14** : Échappement des cellules transformées par HTLV-1 à la réponse cytotoxique. Les cellules transformées par HTLV-1 perdent fréquemment l'expression de Tax, qui est associée, non seulement à l'expression de HBZ (capable d'inhiber la transcription des gènes viraux sur le brin sens du provirus), mais aussi à des modifications génétiques, telles que des mutations dans le gène de Tax, la délétion du LTR en 5' ou une hyperméthylation du LTR en 5'. L'inhibition de l'expression de Tax permet notamment de limiter la reconnaissance des cellules infectées par les CTLs. **Adapté de Futsch et al., 2017.**

### 3.1.2. Le TGF- $\beta$ et l'IL-10 : des cytokines immunosuppressives au service de la pathogénèse

Il a été observé que des cellules leucémiques fraîchement isolées de patients ATLL expriment et produisent constitutivement du TGF- $\beta$ , au même titre que des lignées lymphocytaires issues de patients ATLL et maintenues en culture avec de l'IL-2 (Niitsu et al., 1988 ; Tandler et al., 1991 ; Kim et al., 1990). De plus, l'expression du TGF- $\beta$  par les cellules circulantes issues de patients ATLL (PBMCs totaux ou lymphocytes T CD4+) est plus élevée en comparaison de porteurs asymptomatiques ou de donneurs sains. Le sérum des patients ATLL contient des niveaux élevés d'IL-10 en comparaison de porteurs asymptomatiques ou de donneurs sains (Mori et al., 1996 ; Kchour et al., 2013 ; Kagdi et al., 2018). Les patients présentant une forme

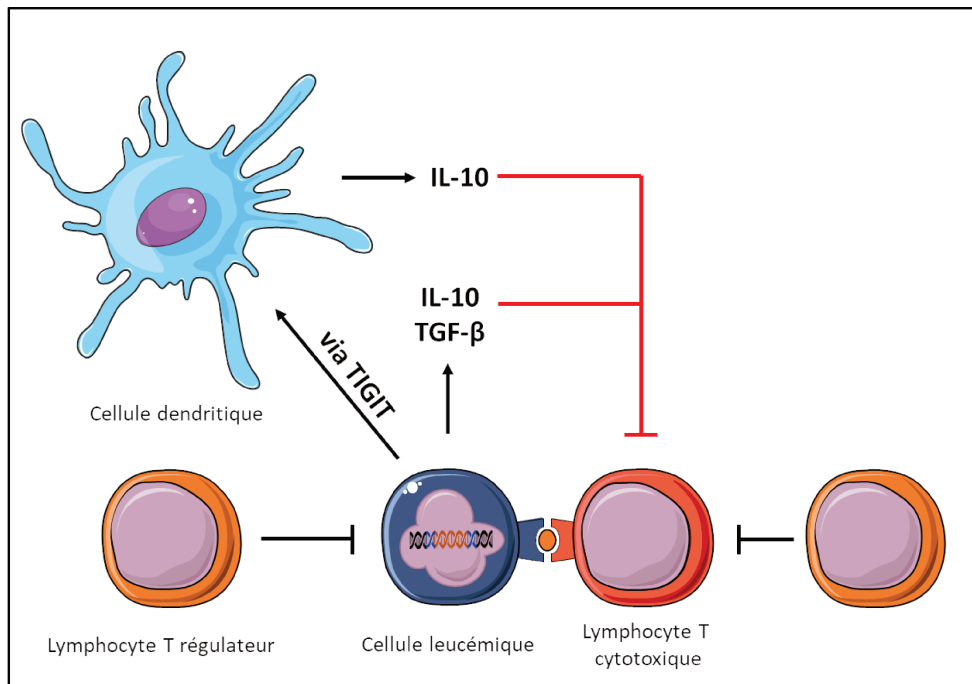
agressive de l'ATLL ont par ailleurs des niveaux d'IL-10 plus élevés, associant ainsi une concentration élevée de cette cytokine avec un pronostic défavorable (Inagaki et al., 2006 ; Kagdi et al., 2018). De manière similaire à ce qui est observé pour le TGF- $\beta$ , des cellules leucémiques isolées de patients avec un ATLL sont capables de spontanément produire de l'IL-10 (Mori et al., 1996 ; Sawada et al., 2017). Ainsi, la surexpression de ces deux cytokines anti-inflammatoires par les cellules infectées peut contribuer à la mise en place d'un environnement immunosuppresseur. L'expression de Tax contribue notamment à l'expression du TGF- $\beta$  et de l'IL-10 dans les cellules infectées (Kim et al., 1990 ; Mori et al., 1996). Cependant, l'extinction de l'expression de la protéine Tax dans les cellules leucémiques in vivo suggère que d'autres cellules, protéines ou mécanismes doivent être responsables de la production d'IL-10 et de TGF- $\beta$  chez les patients ATLL. HBZ, dont l'expression reste conservée chez ces patients, pourrait potentiellement favoriser la production de l'IL-10. En effet, l'expression de HBZ dans des lymphocytes T CD4+ murins promeut l'expression de l'IL-10 (Yasuma et al., 2016). De plus, HBZ favorise l'expression de TIGIT (T-cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains), dont la reconnaissance par les cellules dendritiques induit une production d'IL-10 (Yasuma et al., 2016) (**Figure 15**). L'IL-10 est une cytokine qui atténue les réponses inflammatoires, via l'inhibition de la présentation antigénique, de la prolifération et des fonctions effectrices des lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Pour revue : Blackburn and Wherry, 2007).

### 3.1.3. État des réponses T cytotoxiques et T régulatrices

Les individus infectés possèdent des lymphocytes T cytotoxiques capables de reconnaître les antigènes viraux de HTLV-1 (Pour revue : Bangham and Osame, 2005). Tandis que les lymphocytes T CD8+ des porteurs asymptomatiques sont capables de reconnaître un large panel d'antigènes de HTLV-1 après présentation par divers haplotypes du CMH-I, ceux des patients ATLL ont un répertoire d'épitopes réduit et une réduction de l'expression de perforine et de granzyme (Kozako et al., 2006). Chez les individus asymptomatiques et les patients ATLL, l'expression du marqueur d'épuisement cellulaire PD-1 (Programmed Death 1) par les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de Tax corrèle positivement avec la charge provirale et négativement avec la production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) après stimulation antigénique (Masaki et al., 2018). Une étude a également observé que la fréquence de lymphocytes T CD8+ exprimant PD-1 est plus grande chez les patients ATLL, en comparaison de porteurs asymptomatiques (Kozako et al., 2009). Ainsi, la plus grande

expression de PD-1 chez les patients ATLL pourrait favoriser un échappement du virus HTLV-1 au contrôle immunitaire. L'immunomodulation via PD-1 nécessite la reconnaissance de son ligand PD-L1 (Programmed Death Ligand 1) ou PD-L2 (Pour revue : Wherry and Kurachi, 2015). Tandis que l'expression de PD-L1 n'est pas observée à la surface des lymphocytes infectés chez les porteurs asymptomatiques, environ 20 % des patients ont des cellules leucémiques PD-L1+ (Kozako et al., 2009). L'expression de PD-L1 à la surface des cellules leucémiques semble également inductible via l'activation du TCR in vitro (Shimauchi et al., 2007), au contraire de PD-L2. L'expression des ligands PD-L1 et PD-L2 a notamment été observée à la surface de macrophages infiltrés dans les lymphomes de patients ATLL (Horlad et al., 2016). De manière intéressante, un autre marqueur d'épuisement des lymphocytes T CD8+, CD160, est exprimé de manière préférentielle chez les patients ATLL et les porteurs asymptomatiques en comparaison des donneurs sains, et de manière préférentielle à la surface des CTLs spécifiques de l'antigène Tax (Chibueze et al., 2014). En résumé, l'expression de marqueurs d'épuisement à la surface des lymphocytes T CD8+, et leur potentielle activation, favorise l'échappement des cellules infectées au contrôle immunitaire.

La réponse T cytotoxique peut également être inhibée par les lymphocytes T régulateurs. En effet, les patients ATLL ont un nombre élevé de lymphocytes T CD4+Foxp3+ (Forkhead box p3) par rapport aux donneurs sains (Satou et al., 2012 ; Toulza et al., 2009), ce qui peut potentiellement être associé à l'expression accrue du TGF- $\beta$  chez ces patients, puisque cette cytokine stimule la génération des lymphocytes T régulateurs (Treg) à travers l'induction de l'expression de Foxp3 (Pour revue : Yang et al., 2010). Les lymphocytes T régulateurs sont capables d'inhiber à la fois la prolifération autologue des lymphocytes T CD4+CD25+ des patients ATLL et le taux de lyse des lymphocytes T CD4+Tax+ par des lymphocytes T CD8+ autologues (Toulza et al., 2009). Ceci suggère que les lymphocytes T régulateurs peuvent avoir à la fois un rôle bénéfique et un rôle non bénéfique dans le contrôle du développement de l'ATLL (Figure 15).



**Figure 15** : Échappement des cellules transformées par HTLV-1 au contrôle immunitaire. Les cellules infectées de patients ATLL peuvent produire de l'IL-10 et du TGF- $\beta$ . L'expression de TIGIT par ces cellules induit la production d'IL-10 par les cellules dendritiques. Ces deux cytokines immunomodulatrices favorisent la diminution de la réponse cytotoxique. L'élévation de la fréquence des lymphocytes Treg est capable de limiter l'activité lytique des lymphocytes T cytotoxiques mais également de limiter la prolifération des lymphocytes T infectés. **Adapté de Futsch et al., 2017.**

### 3.1.4. Altérations de la réponse immunitaire innée

Les patients ATLL sont aussi phénotypiquement caractérisés par des modifications de la fréquence et de la fonctionnalité de plusieurs populations de l'immunité innée, bien que le nombre d'études reste assez restreint. Une diminution de la fréquence des cellules iNKT (Invariant Natural Killer T), des cellules NK CD56+CD16+, des cellules dendritiques myéloïdes et des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) est observée chez les patients ATLL en comparaison de donneurs sains (Azakami et al., 2009 ; Hishizawa et al., 2004 ; Manuel et al., 2013a). Les cellules iNKT isolées de patients ATLL ont une capacité de prolifération et de lyse limitées après stimulation in vitro (Azakami et al., 2009). Les PBMCs de patients ATLL, tout comme les pDCs de porteurs asymptomatiques, produisent moins d'IFN- $\alpha$  après stimulation (Hishizawa et al., 2004). L'infection de monocytes par HTLV-1 inhibe leur différenciation in vitro en cellules dendritiques matures et fonctionnelles (Makino et al., 2000). La diminution de fréquence et les altérations fonctionnelles de ces différentes

populations immunitaires peut compromettre le contrôle de l'infection virale et favoriser la pathogénèse.

### **3.2. HAM/TSP**

#### **3.2.1. Facteurs de risque associés au développement de l'HAM/TSP**

Les facteurs associés au développement de l'HAM/TSP semblent divers. La charge provirale est un important facteur dans la prédiction du développement de l'HAM/TSP lorsque celle-ci est supérieure à 1 %. En revanche, une charge provirale élevée ne suffit pas à justifier le développement de l'HAM/TSP, puisque de nombreux individus asymptomatiques présentent une charge provirale supérieure à 1 % (Pour revue : [Bangham et al., 2015](#)). Des divergences génétiques, telles que des polymorphismes dans les gènes de diverses cytokines ou des variations de l'haplotype du CMH-I peuvent contribuer soit à la prévention du développement de l'HAM/TSP ou au contraire contribuer à son développement. Par exemple, l'expression de l'allèle HLA -A\*02 (Human Leukocyte Antigen) est associée à une charge provirale plus faible et un risque moindre de développer un HAM/TSP, tandis que l'allèle HLA-B\*54 est un facteur qui contribue au développement de l'HAM/TSP (Pour revue : [Bangham et al., 2015](#)). D'autres paramètres, comme l'âge ou le sexe, doivent également être pris en considération. La maladie se développe plus chez les femmes que les hommes et principalement chez les adultes de plus de 50 ans. En dehors de ces paramètres, une réponse immunitaire très active, et qui signe l'HAM/TSP, est un facteur de risque considérable.

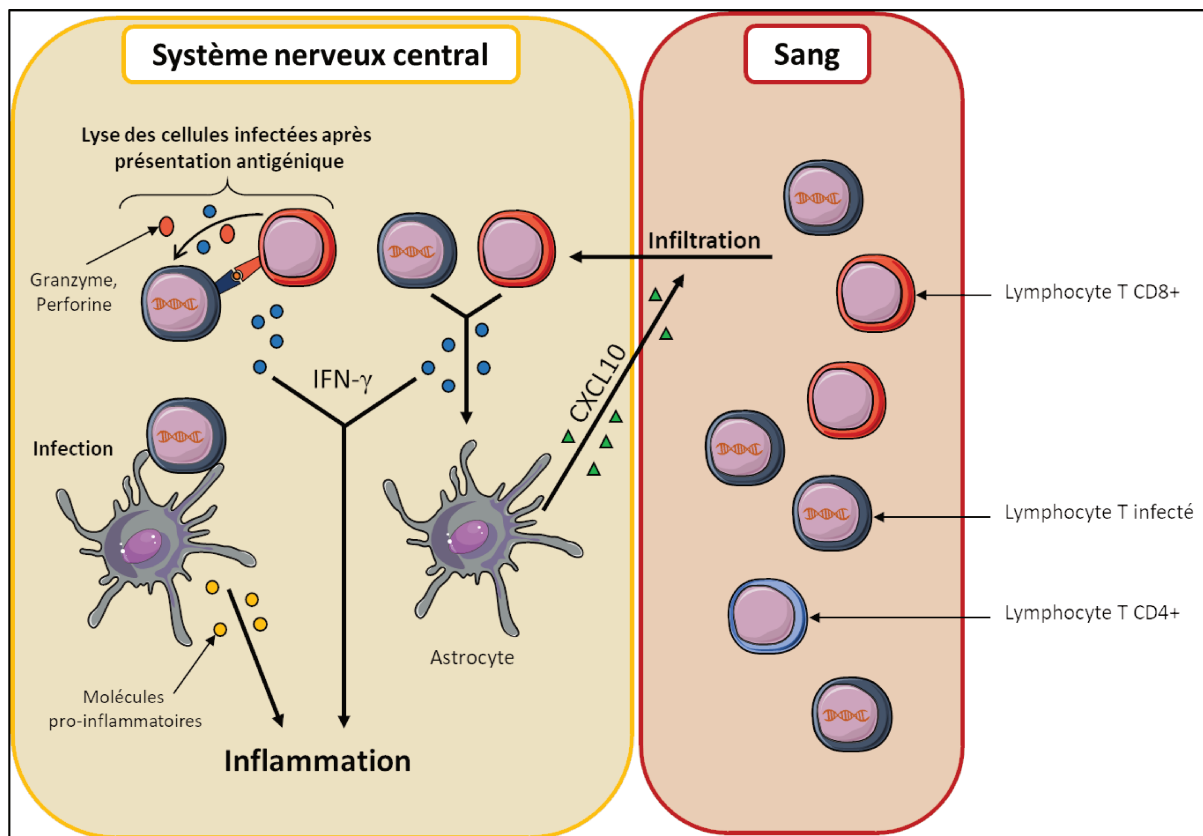
#### **3.2.2. L'HAM/TSP est caractérisée par une signature pro-inflammatoire**

Les lésions du SNC, principalement caractérisées par une destruction des gaines de myéline, sont associées à des infiltrations de lymphocytes T CD4+ et CD8+ dans le parenchyme nerveux et le liquide céphalo-rachidien ([Umehara et al., 1993](#)), et notamment de lymphocytes T CD4+ infectés par HTLV-1 et de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de Tax ([Kubota et al., 2002](#)) ([Nagai et al., 2001](#) ; [Matsuura et al., 2015](#)), favorisant ainsi une élévation de la charge provirale dans le liquide céphalo-rachidien en comparaison du compartiment sanguin chez les patients HAM/TSP ([Nagai et al., 2001](#)). Les lymphocytes T cytotoxiques peuvent reconnaître et éliminer les cellules exprimant Tax dans ces tissus. Cependant, il a été suggéré que cette lyse pourrait causer des dommages collatéraux et notamment l'apoptose de cellules avoisinantes.

Une apoptose des oligodendrocytes a notamment été observée dans le SNC des patients HAM/TSP, ce qui pourrait contribuer à la démyélinisation des tissus nerveux (Matsuura et al., 2015). Ainsi, la réponse cytotoxique qui permet initialement de contrôler la réplication virale, peut également présenter des effets contraires en favorisant la pathogenèse. Les dommages des tissus neuronaux peuvent notamment être associés à la production accrue de molécules pro-inflammatoires. Il a été observé que les lymphocytes issus du sang de patients HAM/TSP expriment plusieurs cytokines pro-inflammatoires de manière basale (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ), en comparaison de donneurs sains (Tendler et al., 1991). De plus, les patients HAM/TSP ont dans leur plasma une concentration élevée de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, comprenant l'IL-6, l'IFN- $\gamma$ , l'IL-4 ou le TNF- $\alpha$  par rapport aux porteurs asymptomatiques ou aux donneurs sains (Neco et al., 2017 ; Starling et al., 2013 ; Chaves et al., 2016). Les lymphocytes T CD4+ infectés qui se retrouvent infiltrés dans le SNC sont capables de produire de l'IFN- $\gamma$  par le biais de l'expression de Tax (Araya et al., 2014). Tax est en effet capable de stimuler l'activité de T-bet (T-box Transcription Factor), qui à son tour assure l'expression de l'IFN- $\gamma$ . De manière intéressante, environ 30 % des gènes différemment régulés entre des patients HAM/TSP et des porteurs asymptomatiques sont des gènes de réponses à l'IFN (Tattermusch et al., 2012), ce qui est le témoin d'une signature de l'activité IFN chez les patients HAM/TSP, laquelle peut être associée, au moins en partie, à l'élévation de l'expression de l'IFN- $\gamma$ . En plus de l'IFN- $\gamma$ , les lymphocytes T CD4+ infectés expriment d'autres marqueurs, comme CXCR3 (C-X-C chemokine receptor type 3), impliqué dans la migration lymphocytaire sous l'impulsion de ses ligands CXCL9 (C-X-C motif chemokine Ligand 9) et CXCL10. La concentration plasmatique de ces deux chimiokines est plus élevée chez les patients HAM/TSP que chez les porteurs asymptomatiques ou donneurs sains (Neco et al., 2017 ; Chaves et al., 2016). Le niveau de CXCL9 et CXCL10 est même plus élevé chez les individus infectés qui ont une charge provirale supérieure à 1 % par rapport aux individus avec une charge provirale inférieure à 1 % (Chaves et al., 2016). De plus, le niveau de CXCL9 et CXCL10 dans le liquide céphalo-rachidien corrèle positivement avec la progression de la maladie (Sato et al., 2013). Il a été proposé que l'expression de ces chimiokines favorise la migration des lymphocytes T CD4+ et CD8+ vers le SNC (Pour revue : Yamano and Coler-Reilly, 2017). En effet, il y a une concentration élevée de nombreuses cellules exprimant CXCR3 dans le liquide céphalo-rachidien. De plus, le pourcentage de cellules CXCR3+ dans le compartiment sanguin des patients HAM/TSP est inférieur à celui de porteurs asymptomatiques ou de donneurs sains, ce qui suggère une infiltration des cellules CXCR3+ dans le liquide céphalo-rachidien (Ando et al., 2013). L'élévation de la concentration en CXCL10 dans le SNC peut notamment être

attribuée aux astrocytes. En effet, si l'IFN- $\gamma$  est capable de stimuler la production de CXCL10 par les astrocytes (Ando et al., 2013), le surnageant de culture de cellules HTLV-1 suffit, en 30 minutes, à induire l'expression différentielle de plusieurs gènes par les astrocytes in vitro, dont CXCL10 (Gudo et al., 2015). Chez les patients HAM/TSP, l'ARN de HTLV-1 a pu être observé dans certains astrocytes par hybridation in situ (Lehky et al., 1995 ; Levin et al., 2001). De manière intéressante, la présence de l'ADN de HTLV-1 peut également être détecté dans certains astrocytes par PCR (Polymerase Chain Reaction) in situ (Levin et al., 2001). Cette observation suggère que les astrocytes peuvent être infectés par HTLV-1 in vivo. In vitro, l'expression de Tax induit des modifications phénotypiques dans les astrocytes. En plus de contribuer à la réponse inflammatoire par la sécrétion de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\alpha$ , de MMP-2 (Matrix Metalloproteinase 2) ou de MMP-9, les astrocytes, via l'expression de Tax, peuvent devenir des cibles potentielles de la réponse T cytotoxique dirigée contre HTLV-1 (Méndez et al., 1997) (Szymocha et al., 2000), favorisant ainsi les dommages tissulaires dans le SNC.

En résumé, les lymphocytes T CD4+ infectés produisent de l'IFN- $\gamma$  et expriment le récepteur CXCR3. Ces lymphocytes T, après avoir franchi la barrière hémato-encéphalique pour se retrouver dans le SNC, peuvent interagir avec des cellules résidentes, et notamment avec les astrocytes, qui pourront, en réponse à l'IFN- $\gamma$  sécrété par les lymphocytes T CD4+ infectés, produire du CXCL10. Cette chimiokine pourra à son tour conduire à l'infiltration dans le SNC de différentes cellules exprimant le récepteur CXCR3, telles que les lymphocytes T CD4+ infectés ou non, et les lymphocytes T CD8+. Ces différentes populations lymphocytaires, via la production active de cytokines pro-inflammatoires, contribueront à la mise en place d'une inflammation chronique dans le tissu nerveux, avec notamment une lésion des oligodendrocytes, des cellules gliales et des astrocytes (Pour revue : Yamano and Coler-Reilly, 2017) (Figure 16).



**Figure 16** : Modèle de la pathogenèse de l’HAM/TSP. Les lymphocytes T CD4+ et CD8+ de la circulation sanguine s’infiltrent dans le système nerveux central, à l’intérieur duquel, la production d’IFN- $\gamma$  favorise la production de CXCL10 par les astrocytes, ce qui favorise ainsi la mise en place d’un gradient chimiotactique de CXCL10 et l’infiltration accrue des lymphocytes dans le SNC. Les différentes cytokines pro-inflammatoires produites par les lymphocytes ou les astrocytes contribuent à l’inflammation des tissus nerveux. **Adapté de Futsch et al., 2017.**

### 3.2.3. État des réponses T cytotoxiques et T régulatrices

De manière surprenante, les patients HAM/TSP présentent une proportion de CTLs totaux exprimant le marqueur d’épuisement PD-1 équivalente à celle des patients ATLL (Manuel et al., 2013b). Cependant, chez les patients HAM/TSP, les CTLs spécifiques de Tax expriment moins de PD-1 que les mêmes CTLs chez les individus asymptomatiques (Kozako et al., 2011) (Abdelbary et al., 2011 ; Ndhlovu et al., 2011). En parallèle, il y a moins de lymphocytes T CD8+ positifs pour un autre marqueur d’épuisement, TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3), chez les patients HAM/TSP en comparaison de donneurs sains. Plus précisément, le pourcentage de CTLs spécifiques de Tax exprimant TIM-3 est réduit chez les patients HAM/TSP comparé aux porteurs asymptomatiques (Abdelbary et al., 2011) (Ndhlovu et al., 2011). Sachant qu’il y a une corrélation inverse entre la fréquence de CTLs



TIM-3+ et la production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  après stimulation par des peptides Tax (Shimauchi et al., 2007), ces différentes études suggèrent qu'il y a potentiellement une réduction du contrôle de la réponse T cytotoxique dirigée contre Tax chez les patients HAM/TSP. De plus, une altération de la réponse T régulatrice a également été observée, puisque les lymphocytes T CD4+CD25+ des patients HAM/TSP ont une expression réduite de Foxp3 en comparaison d'individus sains et de porteurs asymptomatiques, ce qui est associée à une réduction des capacités antiprolifératives de ces cellules (Yamano et al., 2005 ; Oh et al., 2006), et probablement à une limitation du contrôle des réponses cytotoxiques.

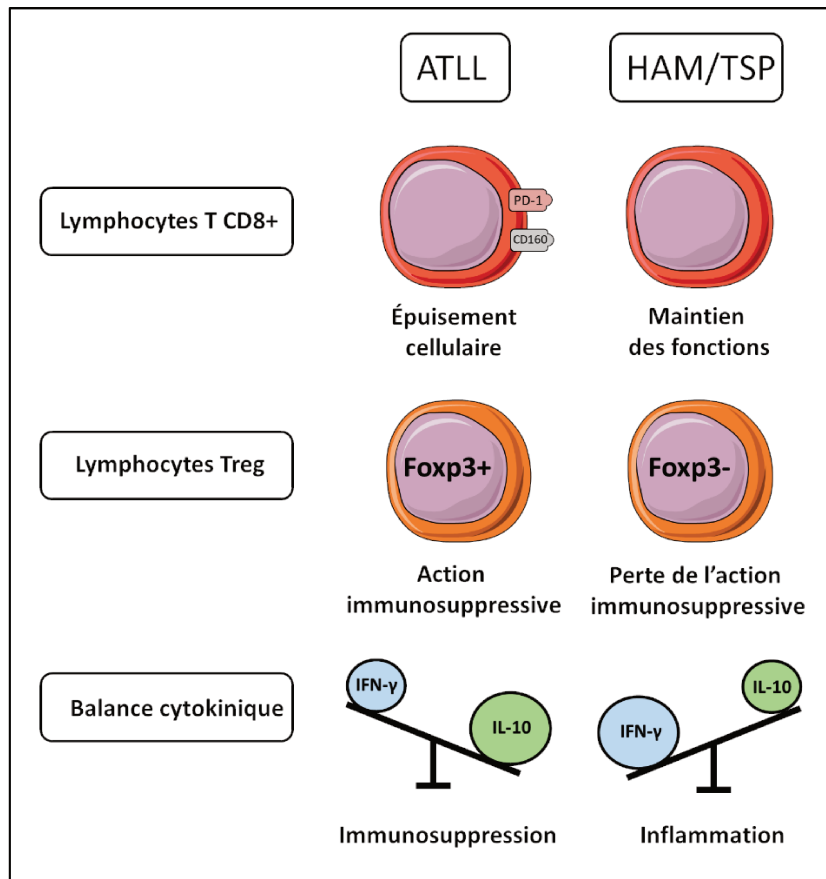
### 3.2.4. Altérations de la réponse immunitaire innée

À l'instar de ce qui est observé chez les patients ATLL, il y a également des altérations de la réponse immunitaire innée chez les patients HAM/TSP. Il y a notamment une diminution, dans le sang, de la fréquence des cellules iNKT, des cellules NK CD56+CD16+, des cellules dendritiques myéloïdes et des pDCs, comme observé pour les patients ATLL (Ndhlovu et al., 2009 ; Wu et al., 2000 ; Azakami et al., 2009 ; Manuel et al., 2013a). Cependant, une seule étude a montré qu'il n'y avait pas de diminution de la fréquence de ces différentes populations chez les patients HAM/TSP (hormis iNKT car non déterminé) par rapport aux donneurs sains (Tattermusch et al., 2012). Cette différence surprenante pourrait notamment être le résultat de divergences dans le protocole expérimental. Les patients HAM/TSP ont moins de monocytes classiques et plus de monocytes intermédiaires dans le sang en comparaison des porteurs asymptomatiques et donneurs sains. Non seulement les monocytes des individus infectés expriment de manière plus importante le récepteur CXCR3, mais ces derniers expriment constitutivement des chimiokines, comme CXCL9 et CCL5 (Amorim et al., 2014 ; Castro-Amarante et al., 2015). Il est donc possible qu'in vivo, les monocytes classiques, via l'expression de CXCR3, migrent de manière préférentielle vers le SNC, ce qui expliquerait leur fréquence réduite dans le sang. De manière similaire à ce qui a été observé chez les patients ATLL, les patients HAM/TSP ont également une diminution de la capacité de leurs monocytes à se différencier en cellules dendritiques matures et fonctionnelles in vitro (Nascimento et al., 2011). Cette altération pourrait notamment contribuer à limiter la génération de cellules dendritiques tolérogènes, aux propriétés immunosuppressives. Les cellules iNKT isolées de patients HAM/TSP ont une capacité de prolifération et de lyse limitées après stimulation in vitro (Azakami et al., 2009). Les cellules NK de patients HAM/TSP ont une capacité de lyse de la lignée rapportrice tumorale K562 qui est moins efficace par rapport aux cellules NK de

donneurs sains (Fujihara et al., 1991). Cependant, le rôle des cellules NK dans le contrôle de l'infection par HTLV-1 in vivo reste controversé puisqu'in vitro, les cellules NK ne peuvent pas lyser des lymphocytes T CD4+ autologues infectés par HTLV-1 (Banerjee et al., 2007). Il a été suggéré que ce résultat provient d'une part de la faible expression des ligands NCR (Natural Cytotoxicity Receptors) et NKG2D (Natural Killer Group 2 member D) et d'autre part de la sous expression d'ICAM-1, à la surface des cellules infectées, ce qui limite l'activation des cellules NK par ces dernières ainsi que leur adhésion, respectivement.

### **3.3. À la frontière des deux maladies : balance entre pro-inflammation et immunosuppression**

Plusieurs observations permettent de définir des points de divergence dans la réponse immunitaire qui peuvent participer à l'orientation vers le développement de l'ATLL ou de l'HAM/TSP. Le premier point correspond à la fonction des lymphocytes T cytotoxiques. Le développement de l'ATLL est probablement lié à une inhibition de la réponse T cytotoxique via l'augmentation de l'expression de récepteurs inhibiteurs à leur surface et/ou l'inhibition de l'expression des protéines immunogènes, telles que Tax. Au contraire, chez les patients HAM/TSP, la plus faible expression des récepteurs inhibiteurs à la surface des lymphocytes T cytotoxiques assure probablement une activation continue de ces cellules et le développement d'une inflammation chronique. Le deuxième point correspond à l'importance de la fonction T régulatrice, puisque des altérations dans la fréquence et/ou la fonction de ces cellules peut limiter ou non la réponse T cytotoxique dirigée contre HTLV-1. Le troisième point correspond à la différence d'expression entre Tax et HBZ. Si Tax favorise l'expression de l'IFN- $\gamma$ , HBZ favorise l'expression de molécules anti-inflammatoires, telles que l'IL-10. Ainsi, on peut entreprendre un potentiel équilibre de ces deux cytokines, dont le ratio semblerait déterminant pour définir un état asymptomatique ou symptomatique, et plus précisément en fonction de la cytokine dominante, le type de maladie associée (**Figure 17**). Le mécanisme qui pourrait régir la rupture de cet équilibre reste cependant inconnu. Indépendamment de la fonction des protéines virales dans l'orientation de la réponse immune, une famille de molécules est particulièrement impliquée dans la double fonction entre inflammation et immunosuppression, et notamment lors des infections virales chroniques, à savoir la famille des IFN-I (Pour revue : Snell et al., 2017).



**Figure 17** : Dichotomie de certains paramètres immunitaires entre les patients ATLL et HAM/TSP. Les patients ATLL sont caractérisés par un épuisement des fonctions T cytotoxiques, un renforcement de l'action immunosuppressive induite par les lymphocytes Treg et une augmentation du niveau d'IL-10 dans l'organisme, tandis que les patients HAM/TSP sont caractérisés par un maintien des fonctions cytotoxiques, une potentielle perte de l'action immunosuppressive des lymphocytes Treg et une augmentation du niveau d'IFN- $\gamma$  dans l'organisme.

## 4. La réponse IFN-I

### 4.1. Généralités

L'IFN-I est défini comme une famille d'interférons comprenant 13 gènes d'IFN- $\alpha$ , un gène unique d'IFN- $\beta$  et des gènes dont les protéines associées sont moins bien caractérisées, comprenant l'IFN- $\epsilon$ , - $\delta$ , - $\kappa$ , - $\tau$ , - $\omega$  et  $\zeta$  (Pour revue : McNab et al., 2015). Parmi les autres molécules d'IFN, on retrouve également l'IFN-II, comprenant comme seul membre l'IFN- $\gamma$  et les IFN-III, comprenant les IFN- $\lambda$  1, 2, 3 et 4. Les molécules d'IFN-I sont des cytokines produites en réponse aux infections microbiennes, et qui présentent à la fois des propriétés

antivirales, antiprolifératives et pro-apoptotiques. Presque toutes les cellules de l'organisme peuvent produire les molécules d'IFN- $\alpha$  et - $\beta$  (Pour revue : [Tomasello et al., 2014](#)).

#### 4.2. Mécanisme de la réponse IFN-I

L'induction de la production d'IFN-I, au même titre que d'autres cytokines pro-inflammatoires, résulte de la reconnaissance de motifs spécifiques aux pathogènes (ou PAMPs pour Pathogen-Associated Molecular Patterns) par des senseurs spécialisés : les PRRs (Pattern Recognition Receptor) (Pour revue : [Brubaker et al., 2015](#)). Les PRRs peuvent reconnaître des ligands microbiens provenant de bactéries, de champignons ou de virus. Les PRRs peuvent être divisés en 5 familles en fonction de la présence de domaines protéiques conservés entre les différents membres : les TLRs (Toll-Like Receptor), les CLR (C-type Lectin Receptor), les NLRs (Nod-like Receptor), les RLRs (RIG-I-Like Receptor) et les ALRs (AIM2-like Receptor). Ces mêmes familles de PRRs peuvent également être séparées en deux classes en fonction de leur positionnement dans la cellule. Les TLRs et CLR se trouvent à la membrane plasmique ou au niveau des membranes vésiculaires de la cellule, tandis que les NLRs, RLRs et ALRs se trouvent dans le cytoplasme.

Les TLRs sont des protéines transmembranaires composées d'une région extracellulaire riche en leucines qui assure la reconnaissance du ligand et d'une région intracellulaire comprenant le domaine TIR (Toll/Interleukin-1 Receptor), essentiel pour la signalisation sous-jacente (Pour revue : [O'Neill et al., 2013](#) ; Pour revue : [Brubaker et al., 2015](#) ; Pour revue : [Jensen and Thomsen, 2012](#) ; Pour revue : [McNab et al., 2015](#)). La famille des TLRs comprend 10 membres chez l'homme. Les TLRs sont capables de reconnaître une large variété de PAMPs. Plus précisément, les TLR-2, -3, -4, -7, -8 et -9 sont associés à la reconnaissance de composants viraux. Tandis que les TLR-2 et -4 sont exprimés à la membrane plasmique et sont capables de reconnaître les glycoprotéines de certains virus, les TLR-3, -7, -8 et -9 sont préférentiellement associés aux vésicules endosomales et reconnaissent des ARN ou ADN viraux. TLR-3 reconnaît de l'ARN double brin, TLR-7 et -8 de l'ARN simple brin et TLR-9 de l'ADN non méthylé et riche en motifs CpG. La reconnaissance d'un PAMP par un TLR induit la mise en place de plusieurs voies de signalisation qui aboutissent à l'activation des facteurs de transcription AP-1 (Activator Protein 1), IRF (Interferon Regulatory Factor), et NF- $\kappa$ B. Tandis qu'AP-1 et NF- $\kappa$ B sont impliqués dans l'induction de l'expression de gènes pro-inflammatoires tels que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-18 et le TNF- $\alpha$ , les IRFs, et plus particulièrement IRF3 et IRF7

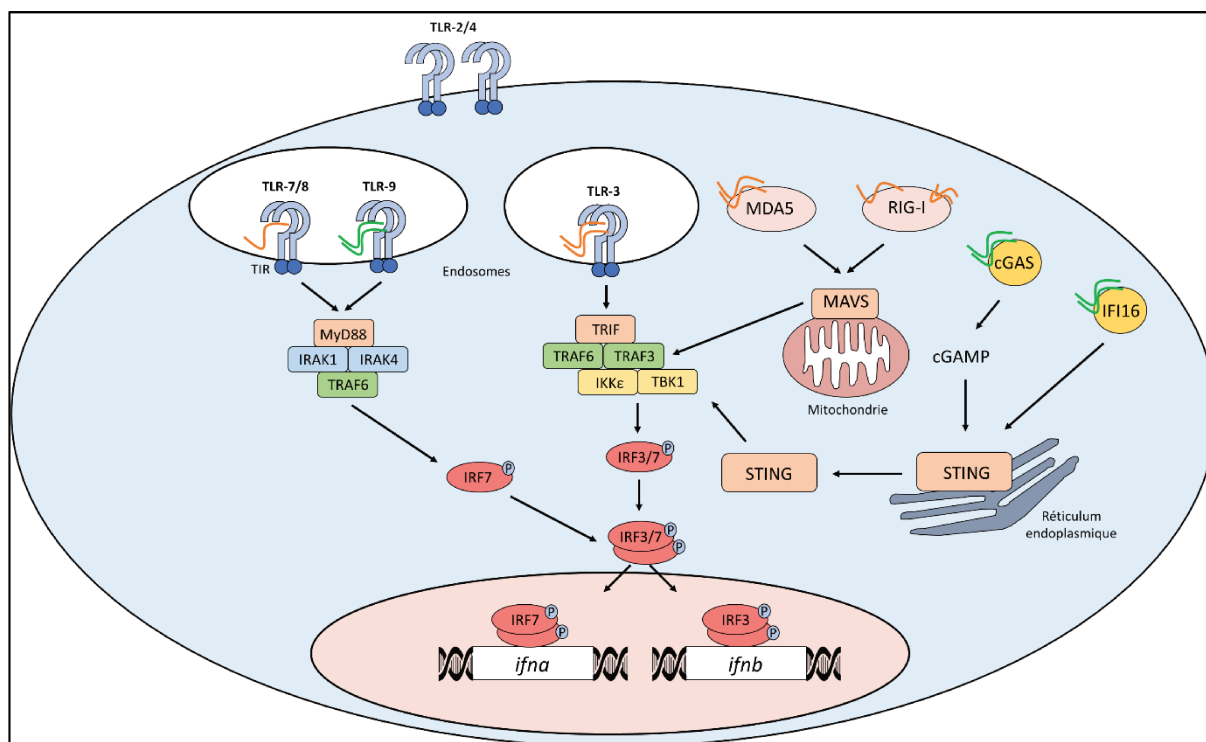
sont essentiels pour l'induction de la réponse IFN-I. Après stimulation, il y a une dimérisation des protéines TLRs et le domaine TIR des récepteurs TLR-7, -8 et -9 recrute l'adaptateur MyD88 (Myeloid Differentiation primary response 88), qui à son tour recrute les kinases IRAK1 et IRAK4 (Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase). IRAK4 phosphoryle IRAK1, qui recrute alors la protéine TRAF6 (Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor), assurant l'activation sous-jacente d'IRF7, NF- $\kappa$ B et AP-1 par le biais de plusieurs protéines intermédiaires. Après reconnaissance de son ligand par TLR-3, ce dernier dimérise. Ceci a pour conséquence de rapprocher les domaines TIRs et d'assurer le recrutement, non pas de MyD88, mais d'un autre adaptateur, TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ), qui sera capable de recruter à son tour TRAF6. La signalisation via TLR-4 combine celles des TLRs cités ci-dessus puisqu'elle est véhiculée simultanément par MyD88 et TRIF. Dans le contexte de la réponse IFN-I et dans la majorité des populations cellulaires, le recrutement de TRAF6 active TRAF3 qui stimule à son tour l'activité de TBK1 (Tank-binding kinase 1) et IKK $\epsilon$  (Inhibitory  $\kappa$ B kinase  $\epsilon$ ). Ces deux kinases sont directement à l'origine de la phosphorylation, et donc de l'activation des facteurs IRF3 et IRF7 (**Figure 18**).

La famille des RLRs comprend les protéines cytosoliques RIG-I (Retinoic acid Inducible Gene-I) et MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated protein 5) ([Pour revue : Brubaker et al., 2015](#) ; [Pour revue : Jensen and Thomsen, 2012](#) ; [Pour revue : McNab et al., 2015](#) ; [Pour revue : Zevini et al., 2017](#)). RIG-I est capable de reconnaître des molécules d'ARN simple brin avec une extrémité 5' non coiffée ou des fragments courts d'ARN double brin, tandis que MDA5 reconnaît des longs fragments d'ARN double brin. Les molécules d'ARN reconnues présentent des structures spécifiques aux ARN viraux, ce qui permet de les différencier des ARN cytosoliques eucaryotes. RIG-I et MDA5 sont capables de reconnaître un large panel de virus à ARN. Après reconnaissance des ARN viraux, RIG-I et MDA5 interagissent avec la protéine adaptatrice MAVS (Mitochondrial Antiviral-Signaling Protein). MAVS, localisée dans la membrane mitochondriale, induit l'activation d'une plateforme de signalisation qui permet in fine l'activation de NF- $\kappa$ B d'une part et l'activation des protéines TBK1 et IKK $\epsilon$  d'autre part (**Figure 18**).

La famille des ALRs comprend des senseurs qui participent à la détection des ADN viraux intracytoplasmiques ([Pour revue : Brubaker et al., 2015](#)). La protéine fondatrice de ce groupe, AIM2 (Absent in Melanoma 2) promeut la formation de l'inflammasome après détection d'ADN intracellulaire. L'inflammasome correspond à un complexe multiprotéique qui promeut

l'inflammation par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et la mort rapide des cellules. Un second senseur parmi le groupe des ALRs, IFI16 (Interferon- $\gamma$  Inducible protein 16), est non seulement capable d'induire la formation de l'inflammasome mais aussi d'induire une production d'IFN-I. Le rôle des ALRs dans la production d'IFN-I reste cependant controversé puisque la suppression de l'ensemble des gènes de la famille des ALRs chez la souris n'impacte pas la réponse IFN-I en réponse à une infection par un virus à ADN (Gray et al., 2016), suggérant ainsi l'existence d'autres senseurs cytosoliques de l'ADN viral. Parmi ceux qui furent découverts et étudiés, celui qui semble avoir le rôle le plus important dans l'induction de la réponse IFN-I est cGAS (Cyclic GMP-AMP Synthase) (Pour revue : Vance, 2016). Lorsqu'il reconnaît de l'ADN double brin viral, cGAS subit un changement conformationnel qui lui permet d'assurer la synthèse enzymatique de cGAMP (cyclic GMP-AMP). cGAMP peut se fixer à la protéine STING (Stimulator of Interferon Genes), qui recrute alors la protéine TBK1 pour phosphoryler IRF3 (Pour revue : Brubaker et al., 2015 ; Pour revue : Zevini et al., 2017). IFI16 et cGAS ont des effets synergiques dans l'activation de STING, puisqu'IFI16 potentialise l'activation de STING par cGAMP (Almine et al., 2017) (Figure 18).

La famille des NLRs et celle des CLR s participent à la mise en place de l'inflammasome et à la régulation de la réponse immunitaire, respectivement. Il est suggéré que les membres de la famille des NLRs agissent rarement comme senseurs directs d'éléments viraux mais qu'ils sont plutôt activés après des stress cellulaires liés à la réplication virale (perturbations membranaires, génération de dérivés réactifs de l'oxygène) (Pour revue : Jensen and Thomsen, 2012 ; Pour revue : Wilkins and Gale, 2010). Les CLR s quant à eux, semblent surtout impliqués dans la suppression de la réponse IFN-I plutôt que dans son activation (Pour revue : Bermejo-Jambrina et al., 2018).



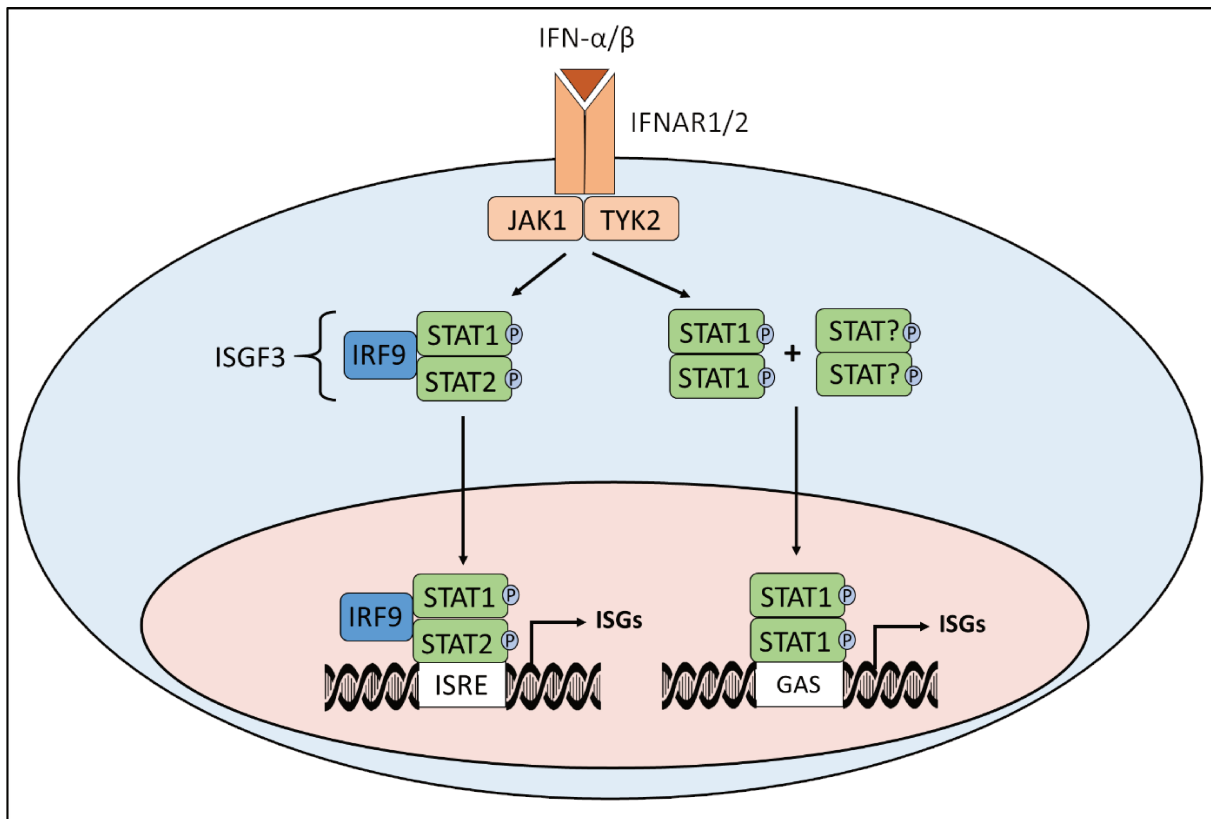
**Figure 18** : Induction de l'expression de l'IFN-I après activation des PRRs. Après reconnaissance de leurs ligands respectifs (ARN simple brin ou ADN non méthylé contenant des motifs CpG, respectivement), les récepteurs TLR-7/8 et TLR-9 dimérisent. Le domaine TIR des récepteurs recrute MyD88, qui à son tour recrute plusieurs protéines (IRAK1, IRAK4 et TRAF6) au sein d'une plateforme de signalisation, ce qui induit la phosphorylation sous-jacente d'IRF7. Après reconnaissance d'ARN double-brin par TLR-3, le domaine TIR recrute la protéine TRIF, qui à son tour recrute plusieurs protéines (TRAF6, TRAF3, TBK1 et IKKε) au sein d'une plateforme de signalisation. TBK1 et IKKε activent les protéines IRF3 et 7. Les senseurs cytoplasmiques MDA5 (qui reconnaît de l'ARN double brin) et RIG-I (qui reconnaît de petits fragments d'ARN double brin et de l'ARN simple brin) activent la protéine mitochondriale MAVS, qui induit l'activation de TBK1 et IKKε. Les senseurs d'ADN cytoplasmique cGAS et IFI16 activent la protéine STING, qui recrute ensuite TBK1. L'activation d'IRF3 ou d'IRF7 conduit à leur dimérisation et leur translocation dans le noyau, où ils pourront stimuler la transcription des gènes de l'IFN-α (via le dimère d'IRF7) et de l'IFN-β (via le dimère d'IRF3). **Adapté de Heaton 2015, Journal of Experimental Medicine.**

La reconnaissance d'un virus par les PRRs converge généralement vers l'activation des facteurs de transcription IRF3 et IRF7, acteurs majeurs de la transcription des gènes de l'IFN-α et -β. Ces facteurs de transcription, une fois phosphorylés par les kinases TBK1 et IKKε, vont former des homodimères et hétérodimères avant de transloquer dans le noyau où ils pourront s'associer aux promoteurs des gènes de l'IFN-α et -β (**Figure 18**). Dans la majorité des cas, la production d'IFN-β est initialement induite par le facteur IRF3 puisque son expression est constitutive dans presque toutes les cellules de l'organisme, au contraire d'IRF7 (**Pour revue : Tomasello et al., 2014**). Cet IFN-β pourra agir de manière autocrine et paracrine pour favoriser la synthèse à la

fois d'IRF3, mais également d'IRF7, ce qui permettra la synthèse des IFN- $\alpha$  en complément de l'IFN- $\beta$  dans un second temps (la quasi-totalité des molécules d'IFN- $\alpha$  nécessitant le facteur IRF7 pour être produites, à l'exception de l'IFN- $\alpha$ 4). Ce rétrocontrôle positif permet de favoriser la production rapide et conséquente de molécules d'IFN-I, afin de limiter la dissémination virale (Pour revue : Tomasello et al., 2014 ; Pour revue : McNab et al., 2015).

Les molécules d'IFN- $\alpha$  et - $\beta$  agissent de manière autocrine ou paracrine et activent la voie de signalisation JAK (Janus kinases)/STAT après leur fixation au récepteur hétérodimérique IFNAR1/2 (Type I Interferon Receptor 1/2), qui leur est commun (Pour revue : Plataniias, 2005 ; Pour revue : McNab et al., 2015 ; Pour revue : Ivashkiv and Donlin, 2014). La ligation d'IFNAR1/2 active les protéines JAK1 et TYK2 (Tyrosine Kinase 2), qui phosphorylent les protéines STAT1 et STAT2. Des hétérodimères de STAT1/STAT2 phosphorylés vont interagir avec IRF9 pour former le trimère ISGF3 (IFN-Stimulated Gene Factor 3). Une fois dans le noyau, ISGF3 reconnaît des séquences ISRE (IFN-Stimulated Response Elements) contenues dans le promoteur d'une multitude de gènes regroupés sous l'appellation d'ISGs (Interferon Stimulated Genes), afin d'assurer leur expression (**Figure 19**). En dehors de ce modèle de signalisation classique, les IFN- $\alpha$  et - $\beta$  peuvent aussi induire la formation d'homodimères de STAT1, qui sont conventionnellement plutôt associés à la signalisation de l'IFN- $\gamma$ . Ces homodimères se fixent sur les promoteurs GAS (Gamma interferon Activation Site). Enfin, les molécules d'IFN- $\alpha$  et - $\beta$  exercent également leur activité à travers les molécules STAT3, 4, 5 (qui activent également les promoteurs GAS) ou via des voies de signalisation PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) ou MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases)/p38.



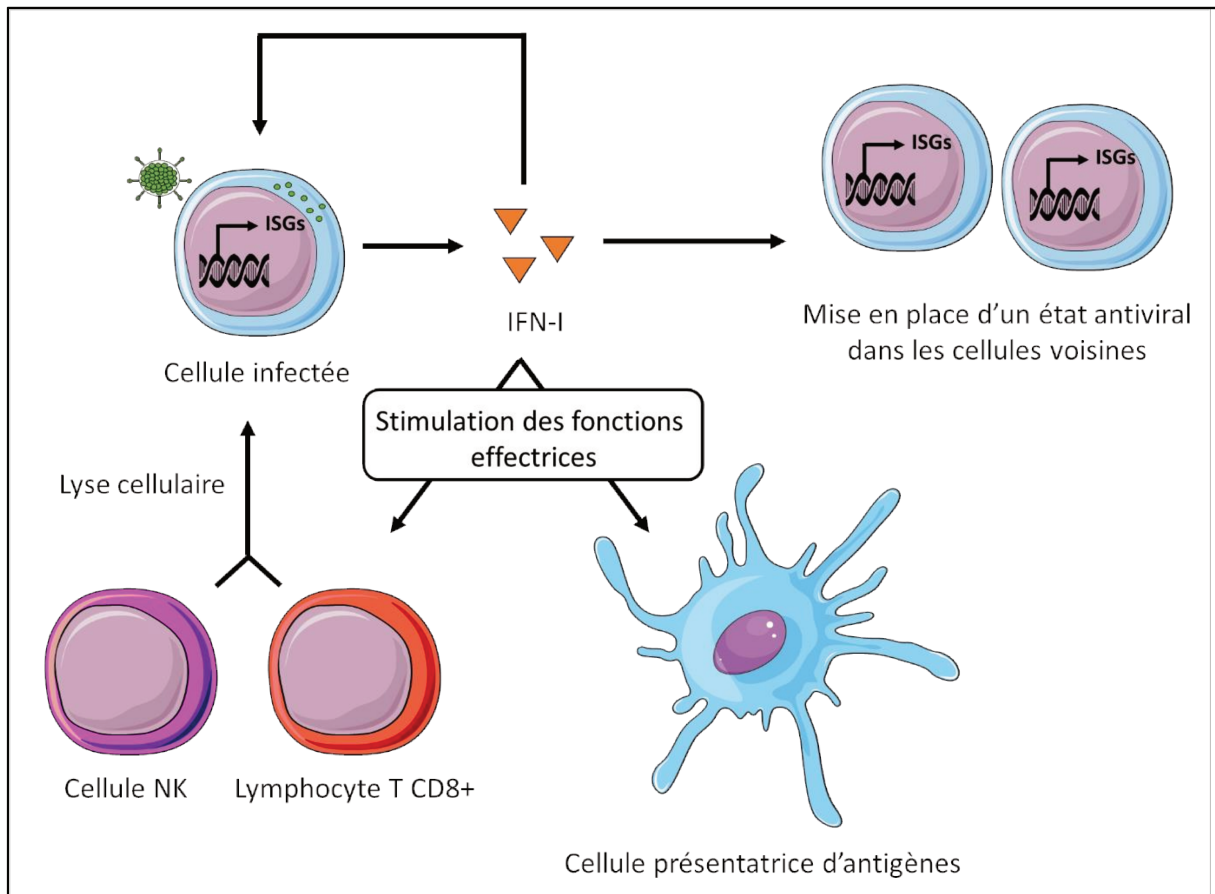


**Figure 19** : Cascade de signalisation induite par l'IFN-I. La fixation de l'IFN-I sur son récepteur IFNAR1/2 induit une activation des protéines JAK1 et TYK2 qui phosphorylent les protéines STAT1 et 2. Les hétérodimères STAT1/2 recrutent le facteur IRF9 avant de transloquer dans le noyau et reconnaître des séquences ISRE, induisant ainsi l'expression de nombreux ISGs. Des homodimères de STAT1 ou des dimères d'autres protéines STAT (indiqués par le point d'interrogation) peuvent transloquer dans le noyau et reconnaître des séquences GAS, ce qui participe également à l'expression d'ISGs. **Adapté de Ivashkiv and Donlin, 2014.**

### 4.3. Fonctions des IFN-I

Les IFN-I favorisent la mise en place d'une défense antivirale à travers deux principaux mécanismes. Le premier rôle de l'IFN-I est l'induction d'un état antiviral au sein de la cellule cible, et ce, via l'induction des ISGs (Pour revue : Tomasello et al., 2014 ; Pour revue : Schneider et al., 2014). Parmi les ISGs figurent les facteurs de restriction. Il s'agit d'un large panel de protéines dont les fonctions sont combinatoires pour mettre un frein à l'infection lors des différentes étapes du cycle viral. Le second rôle de l'IFN-I est de contribuer au développement de la réponse immunitaire innée et adaptative, en favorisant la mise en place d'une réponse de type Th1 (T helper 1), importante contre les infections virales (Pour revue : Tomasello et al., 2014). En effet les IFN-I vont d'une part stimuler la survie des cellules NK

ainsi que leurs fonctions, et d'autre part stimuler la maturation des cellules dendritiques, la présentation antigénique aux lymphocytes T et la production d'IL-12. Les IFN-I peuvent également stimuler directement la différenciation et la fonction des lymphocytes T CD8+ mémoires (Pour revue : McNab et al., 2015) (Figure 20).



**Figure 20** : Fonctions de l'IFN-I. L'IFN-I favorise la mise en place d'un état antiviral intrinsèque via l'expression d'ISGs dans les cellules infectées et non infectées voisines. En plus de cela, l'IFN-I favorise le développement des réponses immunitaires innées et adaptatives. **Adapté de McNab et al., 2015.**

#### 4.4. Importance de l'IFN-I dans le contrôle des infections virales

De manière précoce et transitoire, de larges quantités d'IFN-I peuvent être détectées à la fois dans le sang et la rate dans le contexte d'infections systémiques, ou bien dans des régions de l'organisme plus restreintes dans le contexte d'infections localisées (Pour revue : Tomasello et al., 2014). Cette production d'IFN-I se traduit également par une expression élevée d'ISGs dans les tissus et les lymphocytes T après une infection par LCMV (Virus de la chorioméningite lymphocytaire), HIV ou SIV (Virus de l'immunodéficience simienne). Bien que l'IFN-I

systémique devienne indétectable après la phase aigüe, la transcription des molécules d'IFN-I ou des ISGs reste persistante dans les cellules dendritiques, les lymphocytes T et d'autres tissus lors de la phase chronique (Pour revue : Zuniga et al., 2015). Pour mettre en avant le rôle spécifique de l'IFN-I in vivo, il est important, soit de bloquer sa signalisation, soit d'inhiber sa production.

In vivo, les souris déficientes pour l'expression systémique de IFNAR1 (IFNAR1  $-/-$ ) sont plus susceptibles aux infections par plusieurs virus, dont le virus de la forêt de Semliki, le virus de la vaccine, VSV, LCMV et le virus Influenza, que des souris non mutées. Cette susceptibilité se traduit par une mortalité plus rapide des souris IFNAR1  $-/-$  ainsi qu'une réplication virale accrue (Müller et al., 1994 ; Arimori et al., 2013). En parallèle, des souris déficientes pour l'expression de l'IFN- $\beta$  suite à une mutation du gène de l'IFN- $\beta$ , sont plus sensibles à l'infection par le virus Influenza que des souris qui n'ont pas cette mutation, aussi qualifiées de souris sauvages ou WT (Wild type) (Koerner et al., 2007). Ceci suggère notamment que la fonction de l'IFN- $\beta$  ne peut pas être compensée par l'IFN- $\alpha$ . Des souris IFNAR  $-/-$  ou STAT1  $-/-$  ont une immunopathologie exacerbée après leur infection par le virus Influenza, caractérisée par l'infiltration de granulocytes inflammatoires dans les poumons. Ce phénotype, associable à une activité pro-inflammatoire élevée, est maximal pour les souris STAT1  $-/-$ , intermédiaire pour les souris IFNAR  $-/-$  et moindre pour les souris IFN $\gamma$ R  $-/-$  (IFN- $\gamma$  Receptor) ou WT (Durbin et al., 2000). Ce phénomène est en accord avec d'autres résultats qui montrent que les fibroblastes STAT1  $-/-$  ou IFNAR  $-/-$  sont plus sensibles à l'infection par le virus Influenza in vitro que les fibroblastes issus des animaux WT ou IFN $\gamma$ R  $-/-$  (García-Sastre et al., 1998). De façon similaire à ces études, le blocage de la signalisation IFNAR avant leur infection par SIV dans un modèle de macaques rhésus conduit à une élévation de la charge virale et une progression plus rapide vers la pathogenèse (Sandler et al., 2014). Ces différentes études suggèrent que la signalisation via l'IFN-I participe au contrôle de l'infection in vivo. L'absence d'expression d'IFNAR lors de l'infection par le virus Influenza ne modifie ni la génération des lymphocytes T cytotoxiques ni le taux de clairance virale, mais limite la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Durbin et al., 2000 ; Arimori et al., 2013). Ceci suggère que, dans le contexte du virus Influenza du moins, les IFN-I ne participent pas uniquement à un contrôle de la dissémination virale mais participent également à la prévention de maladies viro-induite, grâce à l'induction de la production d'IL-10. En revanche, une signalisation IFN-I excessive lors d'une infection par Influenza participe à une inflammation accrue, avec une augmentation de la morbidité, des dommages tissulaires, une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires

soutenue, une infiltration de cellules inflammatoires dans les tissus, une induction des récepteurs de mort cellulaire et finalement une hausse de la mortalité (Davidson et al., 2014). Ainsi, des perturbations dans l'activité de l'IFN-I (diminution comme augmentation) semblent contribuer à la pathogenèse.

#### **4.5. Importance de l'IFN-I dans les infections chroniques : bien contre mal ?**

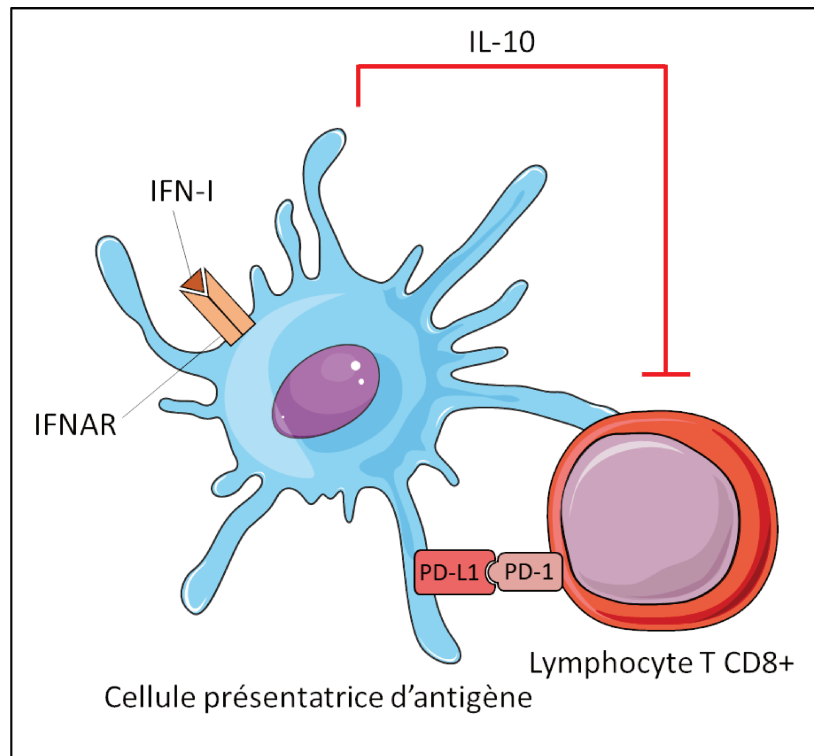
Lors des infections virales aiguës, il y a généralement une production transitoire et élevée d'IFN-I dans le plasma. La production d'IFN-I tend cependant à diminuer après sa production initiale et est souvent indétectable lors des infections persistantes induites par LCMV, HIV, SIV, HCV ou HBV (Pour revue : Zuniga et al., 2015). Cette inhibition de la production systémique d'IFN-I peut être liée à un processus homéostatique de l'organisme, pour limiter les effets délétères d'une expression prolongée aux IFN-I (Pour revue : Lang and Mansell, 2007), ou bien à une régulation par le virus lui-même, soit directement, soit indirectement. Un exemple de suppression viro-induite directe est illustré par la capacité de l'antigène soluble de HBV de réduire la signalisation TLR-9 et ainsi limiter la production d'IFN- $\alpha$  par les pDCs (Xu et al., 2009). Un exemple de suppression viro-induite indirecte peut être l'induction de la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-10 après reconnaissance de la capsid de HCV par les PBMCs (Dolganovic et al., 2006), ces cytokines contribuant à l'atténuation de la production d'IFN-I.

Malgré cette atténuation de la production d'IFN-I lors des infections persistantes, la signature de la fonction de l'IFN-I, observée via l'expression des ISGs, reste quant à elle présente chez les individus infectés par HCV ou HIV, les singes infectés par SIV ou les souris infectées par LCMV (Bolen et al., 2013 ; Rotger et al., 2011 ; Jacquelin et al., 2009 ; Wilson et al., 2013). Le mécanisme qui permet le maintien de cette signature de l'activité de l'IFN-I, en absence de niveaux détectables d'IFN-I dans le sang n'est pas totalement compris, mais pourrait s'expliquer par une sensibilité accrue des cellules à l'IFN-I, ce qui nécessite moins d'IFN-I pour les stimuler, ou bien que l'IFN-I continue à être produit dans des régions localisées (Pour revue : Snell and Brooks, 2015). Les singes verts d'Afrique et les macaques rhésus sont deux espèces simiennes chez lesquelles une forte surexpression des ISGs est observée après l'infection par SIV. L'expression de ces ISGs revient à un niveau basal au bout d'un mois après l'infection pour les singes verts d'Afrique, alors qu'elle reste maintenue dans les macaques rhésus (Jacquelin et al., 2009). De manière intéressante, les singes verts d'Afrique infectés par SIV ne développent pas d'activation immunitaire chronique ni de stade SIDA (Syndrome

d'immunodéficience acquise), au contraire des macaques rhésus. L'infection par SIV du mangabey enfumé (*Cercocebus atys*), qui ne conduit pas non plus au développement du stade SIDA, est également caractérisée par une réponse immunitaire innée robuste pendant la phase aigüe mais rapidement résolue, au contraire de ce qui est observé chez le macaque rhésus (Mandl et al., 2008 ; Bosinger et al., 2009). De manière intéressante, et dans le cadre d'une infection chronique par HIV-1, les individus virémiques qui ne progressent pas vers le stade SIDA présentent un profil d'expression des ISGs plus faible que celui des progresseurs rapides (Rotger et al., 2011). Le maintien de la signature de l'IFN lors de la phase chronique de l'infection corrèle aussi avec une réduction du contrôle viral chez les individus infectés par HIV-1 (Rotger et al., 2011). Ainsi, la persistance de la signature de l'IFN-I semble corrélée avec un pronostic défavorable lors des infections chroniques par HIV ou SIV.

Les premières démonstrations du rôle délétère de l'IFN-I au cours de l'infection chronique ont été mises en évidence dans des modèles murins infectés par LCMV, où l'interaction entre l'IFN-I et son récepteur était abolie (Tejaro et al., 2013 ; Wilson et al., 2013). Si bloquer le récepteur de l'IFN-I réduit la sécrétion précoce de cytokines pro-inflammatoires et entraîne une augmentation du nombre de cellules infectées et du titre viral lors de la phase aigüe de l'infection, il y a, en revanche, un meilleur contrôle de la réplication virale lors de la phase chronique de l'infection par LCMV. Ceci se traduit par une meilleure clairance virale, une restauration de l'architecture physiologique de la rate (normalement perturbée au cours de l'infection par LCMV), une augmentation de la fréquence des populations immunitaires dans la rate et une diminution de l'expression de l'IL-10 et de PD-L1 (Tejaro et al., 2013 ; Wilson et al., 2013). La signalisation chronique de l'IFN-I conduit donc au développement d'un programme immunosuppresseur chez les souris infectées par LCMV, qui pourrait notamment limiter l'activité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et expliquer pourquoi l'absence de signalisation de l'IFN-I contribue à une réduction de la charge virale lors de l'infection chronique des souris par LCMV. L'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> est nécessaire pour le contrôle des virus réplicatifs comme LCMV, SIV, HIV, HCV ou HBV, puisqu'une réponse cytotoxique robuste et multifonctionnelle corrèle avec une protection contre la symptomatologie viro-induite (Pour revue : Zuniga et al., 2015). Les fonctions des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> pendant une infection chronique sont réduites en comparaison de celles des cellules T effectrices ou mémoires générées pendant l'infection aigüe (Pour Revue : Virgin et al., 2009). Cet état de faible réponse des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> est qualifié d'épuisement, phénomène couramment observé lors des infections chroniques humaines et murines et les cas de cancers, et qui semble

associé à la stimulation continue de la réponse cytotoxique (Pour revue : Wherry and Kurachi, 2015). Le phénotype d'épuisement est caractérisé par l'expression continue et élevée de récepteurs inhibiteurs à la surface des cellules : principalement PD-1 mais aussi, TIM-3, LAG3 (Lymphocyte-Activation Gene 3), 2B4 ou CD160 entre autres, qui inhibent la réponse effectrice de la cellule après fixation de leurs ligands. L'expression cumulée de ces marqueurs signe un phénotype d'épuisement plus important (Pour revue : Zuniga et al., 2015 ; Pour revue : Wherry and Kurachi, 2015). LAG3 est notamment exprimé par les lymphocytes T des macaques rhésus mais pas par les lymphocytes T du mangabey enfumé (*Cercocebus atys*) après l'infection par SIV (Bosinger et al., 2009). Indépendamment de ces récepteurs, l'épuisement des lymphocytes T CD8+ peut également être induit par des cytokines immunosuppressives, comme l'IL-10 ou le TGF- $\beta$ . L'IFN-I peut lui-même favoriser cet état d'épuisement puisqu'il est capable d'induire la production de PD-L1 ou d'IL-10 par les cellules présentatrices d'antigènes (Pour revue : Ivashkiv and Donlin, 2014) (Figure 21). Enfin les lymphocytes Treg semblent participer à ce phénomène d'épuisement immunitaire, probablement via la sécrétion de cytokines immunosuppressives (Pour revue : Wherry and Kurachi, 2015). Une expansion de lymphocytes Treg est notamment observée lors des infections chroniques par HIV, HCV ou LCMV, contribuant ainsi au processus d'immunosuppression. L'épuisement cellulaire peut affecter d'autres populations immunitaires, comme les lymphocytes T CD4+, ce qui conduit à une réduction de la production d'IL-2, de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  (Pour revue : Zuniga et al., 2015). L'ensemble de ces phénotypes contribuant à l'immunosuppression rappelle ce qui a été précédemment décrit pour les patients ATLL (Figure 17).



**Figure 21** : L'IFN-I inhibe la réponse T-cytotoxique à travers l'activité des cellules présentatrices d'antigène. En réponse à l'IFN-I, les cellules présentatrices d'antigènes expriment de l'IL-10 et PD-L1, qui favorisent l'inhibition de la réponse T-cytotoxique. **Adapté de Ivashkiv and Donlin, 2014.**

En résumé, l'IFN-I a une fonction ambivalente lors des infections virales. Si les molécules d'IFN-I contribuent à la protection antivirale à travers la production d'ISGs ou le développement des réponses immunitaires innées et adaptatives, elles contribuent également à la persistance des virus dans l'organisme via leurs propriétés immunosuppressives (Pour revue : Snell et al., 2017). L'effet ambivalent de l'IFN-I a également été observé lors de l'administration d'IFN-I aux souris infectées par LCMV. Si une administration précoce, lors de la première semaine de l'infection favorise une augmentation de la fréquence et du nombre absolu de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques du virus, une administration de la même quantité d'IFN-I au-delà d'une semaine d'infection n'a aucun effet (Wang et al., 2012). Dans certains cas, l'administration tardive d'IFN-I peut même être délétère. En effet, chez les macaques rhésus, l'administration continue d'IFN- $\alpha$ 2a durant la phase chronique d'infection par SIV favorise la progression vers le stade SIDA (Sandler et al., 2014). Il est donc concevable que les études qui ont investigué l'effet d'un traitement de patients infectés par HIV-1 avec de l'IFN- $\alpha$  pégylé se sont traduites par des résultats mitigés, avec soit une amélioration du contrôle viral, soit peu ou pas d'effets (Pour revue : Zuniga et al., 2015). Pour d'autres virus, tels que

HBV et HCV, l'IFN- $\alpha$  pégylé est cependant un traitement de référence pour les patients, en conjugaison avec des drogues antivirales (Pour revue : Tan et al., 2018 ; Pour revue : Ghany et al., 2009). De manière intéressante, certains patients infectés par HCV ne répondent pas au traitement de référence qui consiste en une combinaison d'IFN- $\alpha$  et de ribavirine. Ces individus réfractaires présentent généralement une signature IFN-I soutenue avant le traitement (Chen et al., 2005 ; Bolen et al., 2013). Ainsi, il y a non seulement des différences d'efficacité d'un traitement à l'IFN- $\alpha$  selon le type de virus, mais également selon l'état immunitaire des individus infectés. Dans le contexte de HTLV-1, plusieurs études se sont concentrées sur le potentiel de l'IFN-I dans le contrôle de son infection et dans le traitement de ses symptômes.

#### **4.6. La réponse IFN-I dans le contexte de l'infection par HTLV-1**

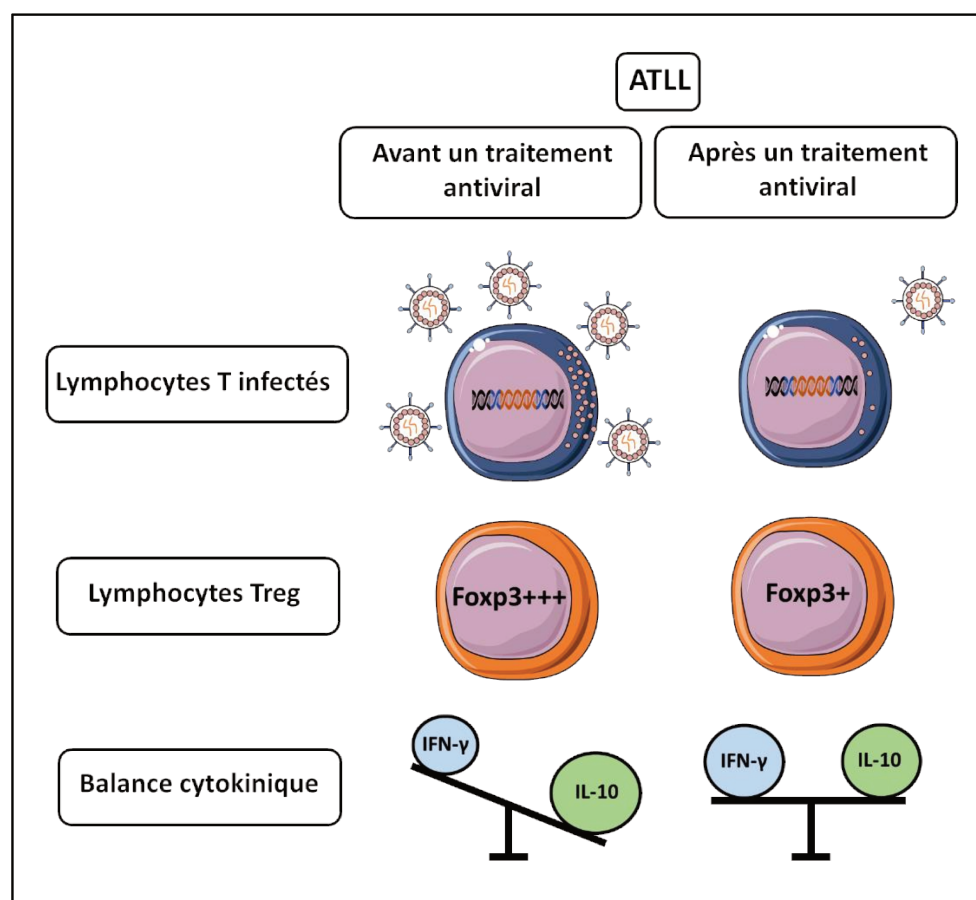
##### **4.6.1. L'IFN-I au service des individus infectés par HTLV-1**

###### **4.6.1.1. L'IFN-I comme traitement de l'ATLL**

Si des résultats positifs ont été obtenus après traitement des patients ATLL avec une combinaison d'IFN- $\alpha$  et d'AZT, le mécanisme antiviral induit par ce traitement reste quant à lui peu documenté. Une étude récente a montré qu'au niveau moléculaire, le traitement combiné se caractérise, chez les patients ATLL qui répondent positivement au traitement, par des modifications phénotypiques des PBMCs entre le moment où démarre le traitement et 1 ou 2 ans après (Macchi et al., 2017). En effet, les PBMCs remis en culture après traitement, au contraire des PBMCs remis en culture avant le début du traitement, sont caractérisés par une inhibition totale de l'activité de rétrotranscription de HTLV-1 (mesurée par un test d'activité de la transcriptase inverse), la réduction de la quantité de protéines de matrice p19 dans le surnageant de culture et la réduction de l'expression des ARNm de Tax et Rex. Le traitement est également capable de modifier le profil de clonalité (monoclonalité vers oligoclonalité) pour certains individus. Bien que l'expression de Tax et Rex dans les PBMCs soit variable selon les patients, la quantité de protéines de matrice p19 dans le surnageant de culture est réduite de 75 à 88 % pour tous les répondeurs en comparaison des mêmes PBMCs avant traitement, au même titre que l'activité de rétrotranscription, qui est inhibée chez tous les répondeurs (Macchi et al., 2017). Une autre étude s'est intéressée, non pas aux marqueurs virologiques, mais plutôt aux marqueurs immunitaires pour évaluer l'impact du traitement combiné de l'IFN- $\alpha$ , de l'AZT et de l'arsenic (Kchour et al., 2013). L'étude vise à mesurer le profil d'expression des cytokines



Th1/Th2/Treg chez les patients avant et après traitement (sur une durée de 30 jours). Le traitement induit une diminution du pourcentage de lymphocytes T CD4+ circulants et une augmentation du pourcentage de lymphocytes T CD8+ circulants. Une diminution du pourcentage de cellules CD4+CD25+, phénotype des cellules infectées in vivo, et de la charge provirale, est observée chez tous les patients après traitement. Le traitement combiné de l'IFN- $\alpha$ , de l'AZT et de l'arsenic induit, chez les patients ATLL, un remodelage de la réponse immunitaire avec une diminution de l'expression des transcrits associés à la réponse Th2/Treg (Foxp3, IL-10 et IL-4) au profit d'une augmentation de l'expression des transcrits associés à la réponse Th1 (IFN- $\gamma$  et IL-2) (Kchour et al., 2013) (Figure 22).



**Figure 22** : Conséquences d'un traitement antiviral des patients ATLL. Un traitement combiné d'IFN- $\alpha$ , de zidovudine et d'arsenic chez les patients ATLL favorise la diminution de l'expression des protéines virales par les cellules infectées, de l'expression de Foxp3, et in fine des fonctions immunomodulatrices, avec une baisse de l'expression de l'IL-10 au profit de l'IFN- $\gamma$ .

Le traitement combiné de l'IFN- $\alpha$ , de l'AZT et de l'arsenic joue ainsi un rôle important dans la mise en place d'un micro-environnement immunitaire antiviral, ce qui contribue probablement

au contrôle de la réplication virale en plus de leurs effets antiviraux directs observés in vitro. Une étude récente a comparé les effets antiviraux de l'IFN- $\alpha$  et de l'IFN- $\beta$  après un traitement ex vivo de PBMCs isolés de patients ATLL (Dierckx et al., 2017). Tandis que l'IFN- $\beta$  présente une capacité antiproliférative et pro-apoptotique plus importante que l'IFN- $\alpha$ , les deux cytokines réduisent de manière similaire la quantité de protéines de matrice p19 dans le surnageant de culture de ces PBMCs (Dierckx et al., 2017).

#### **4.6.1.2. L'IFN-I comme traitement de l'HAM/TSP**

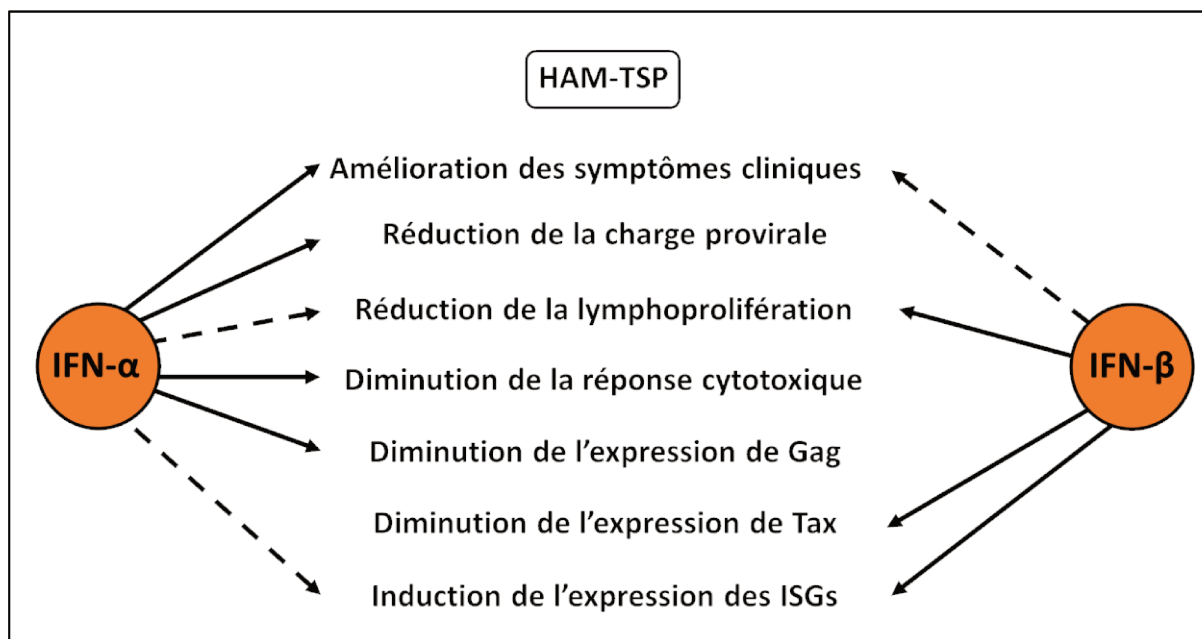
Plusieurs études cliniques réalisées sur des petits groupes de patients HAM/TSP montrent un effet positif de l'IFN- $\alpha$  comme agent thérapeutique. Pour les patients qui répondent au traitement (2/3 des patients HAM/TSP dans la majorité des études), il y a une amélioration des symptômes cliniques pendant et après le traitement, qui se caractérise par une amélioration des performances motrices et une diminution de l'incontinence (Kuroda et al., 1992 ; Nakamura et al., 1990 ; Yamasaki et al., 1997 ; Rafatpanah et al., 2012). D'un point de vue moléculaire, les effets observés varient selon les études. Dans la majorité des études, le traitement des patients HAM/TSP par l'IFN- $\alpha$  inhibe la prolifération lymphocytaire et réduit la charge provirale (Shibayama et al., 1991 ; Yamasaki et al., 1997 ; Rafatpanah et al., 2012 ; Saito et al., 2004). Les études penchent en faveur d'une diminution de la réponse cytotoxique, soit via une réduction de la fréquence des lymphocytes T mémoires et de l'expression de la perforine dans ces cellules (Saito et al., 2004), soit via une moindre expression de l'IFN- $\gamma$  au profit de l'IL-4 (Feng et al., 2004). Enfin, en dehors des analyses qui peuvent être faites à partir des cellules du sang, une étude a associé le traitement des patients HAM/TSP à l'IFN- $\alpha$  avec une diminution de la quantité de cellules CD4+CD25+ dans le liquide céphalo-rachidien (Feng et al., 2003). En conclusion, l'IFN- $\alpha$  semble avoir un effet positif sur l'évolution clinique des patients HAM/TSP mais des études sur le long terme et sur de plus larges cohortes de patients sont nécessaires pour argumenter de sa potentielle utilité dans le traitement des patients. Ex vivo, la remise en culture de PBMCs issus de patients HAM/TSP en présence d'IFN- $\alpha$  montre un effet positif de cette cytokine sur le contrôle de l'infection puisqu'elle inhibe la prolifération spontanée des lymphocytes T CD4+, la prolifération des lymphocytes T CD8+ stimulés par les antigènes viraux, diminue l'expression des antigènes viraux p19 et p24 et limite l'activité de rétrotranscription, tous ces éléments contribuant finalement à la diminution du nombre de copies virales intégrées (Ijichi et al., 1995). Un traitement similaire avait montré dans une autre

étude une diminution du niveau d'expression de Gag dans les lymphocytes T (Tattermusch et al., 2012).

L'effet de l'IFN- $\beta$  sur une petite cohorte de patients HAM/TSP a également été investigué et indique une amélioration légère de la motricité après évaluation clinique (Oh et al., 2005). D'un point de vue moléculaire, le traitement à l'IFN- $\beta$  induit une réduction de la quantité d'ARNm de Tax dans les PBMCs et une réduction de la fréquence de lymphocytes T CD8+ dirigés contre la protéine Tax par rapport à la population CD8+ totale chez les patients (Oh et al., 2005). Ce traitement diminue également la capacité de lymphoprolifération lorsque les PBMCs sont remis en culture. Il n'y a cependant pas de différences au niveau de la charge provirale ou dans le nombre absolu de la population immunitaire CD4+ ou CD4+CD25+ avant et après traitement (Oh et al., 2005). Si l'IFN- $\beta$  semble avoir ici un effet antiprolifératif sur la population totale de PBMCs de manière globale, des clones de cellules infectées issues de patients HAM/TSP, et isolés par dilutions limites, ne subissent pas un effet antiprolifératif avec de l'IFN- $\beta$  (Smith et al., 1999). Il est possible que l'inhibition de la signalisation de l'IFN-I dans les cellules infectées puisse réduire l'activité antiproliférative de l'IFN- $\beta$ , mais que cette activité soit conservée lors du traitement de PBMCs, via l'activation d'un état antiviral global.

Il semble donc que pour les patients HAM/TSP, un traitement à l'IFN-I soutient des réponses différentes qu'il s'agisse d'un traitement à l'IFN- $\alpha$  ou - $\beta$  (**Figure 23**). Tandis que l'IFN- $\alpha$  favoriserait une diminution de la charge provirale et une inhibition de la réponse T cytotoxique, l'IFN- $\beta$  favoriserait la diminution de l'expression de l'ARNm de Tax et le processus de lymphoprolifération. De manière similaire à ce qui a été fait pour les PBMCs issus de patients ATLL (Dierckx et al., 2017), une étude récente a mis en exergue les différences moléculaires que peuvent exercer l'IFN- $\alpha$  et l'IFN- $\beta$  sur des cellules de patients HAM/TSP (Leal et al., 2018). Tandis que le traitement ex vivo de PBMCs issus de patients HAM/TSP par de l'IFN- $\beta$  diminue la lymphoprolifération, l'IFN- $\alpha$  ne présente pas cet effet. Par ailleurs, un traitement sur une courte période (48h) de PBMCs isolés à partir de patients HAM/TSP avec de l'IFN- $\beta$  permet une surexpression de plusieurs facteurs de restriction, dont TRIM5 $\alpha$  (Tripartite Motif containing 5 $\alpha$ ), TRIM22 (Tripartite Motif containing 22) et BST2 (Bone marrow Stromal cell antigen 2)/tétherine, qui n'est pas observée avec de l'IFN- $\alpha$ . L'expression de ces facteurs de restriction corrèle négativement avec l'expression de Tax. Des études complémentaires sont cependant nécessaires, sur un plus large panel de patients, pour confirmer l'efficacité des IFN- $\alpha$  et - $\beta$  dans le traitement des patients HAM/TSP, avec une possibilité éventuelle de combiner

ces deux cytokines lors du traitement. Une étude antérieure a déjà mis en évidence que des effets combinés de l'IFN- $\alpha$  et - $\beta$  permettait un meilleur contrôle de l'infection par HTLV-1 in vitro que les cytokines seules (D'Onofrio et al., 1992). Une combinaison de ces deux cytokines pour le traitement de l'ATLL pourrait également être envisagée sur des patients réfractaires au traitement antiviral déjà mis en place (IFN- $\alpha$  et AZT).

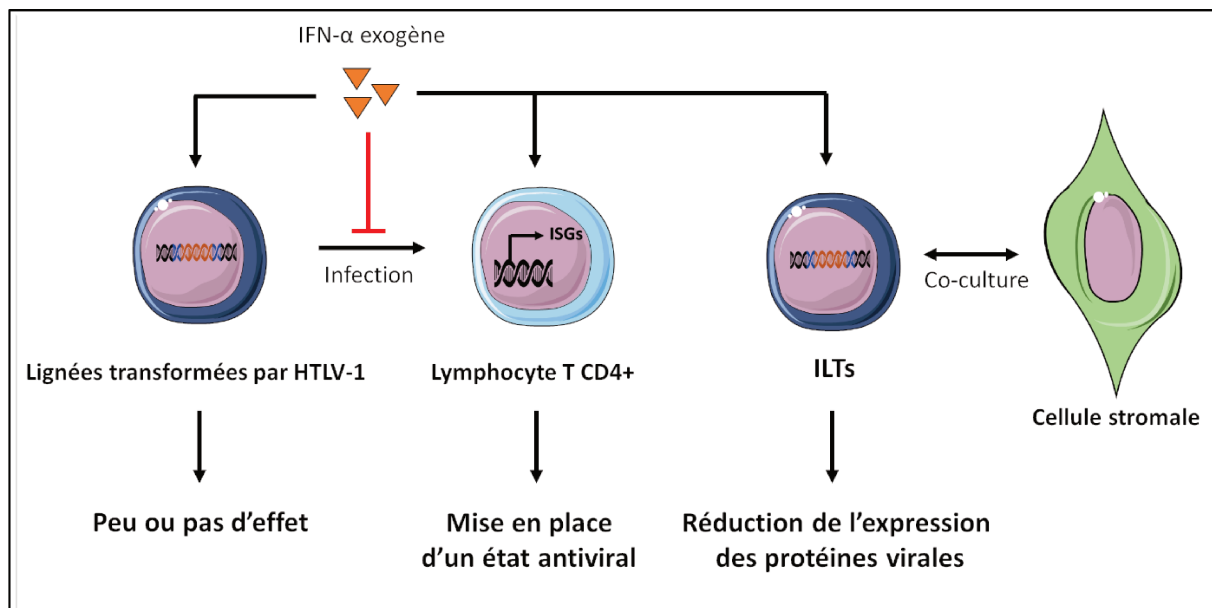


**Figure 23** : Impacts différentiels de l'IFN- $\alpha$  et de l'IFN- $\beta$  sur le traitement des patients HAM/TSP. Les traits pleins sont associés à une relation directe entre le type d'IFN et l'effet observé. Les traits en pointillés mettent en perspective l'effet supérieur d'un type d'IFN par rapport à l'autre sur l'observation d'un effet. L'absence de flèches correspond à des relations non démontrées.

#### 4.6.2. Mécanismes moléculaires du contrôle de l'infection de HTLV-1 par l'IFN-I

L'IFN-I est important pour inhiber la néoinfection d'une cellule par HTLV-1, que ce soit des fibroblastes (Nishida et al., 1985), des PBMCs, des CBMCs (Cord Blood Mononuclear Cells) (Macchi et al., 1990), des lignées lymphocytaires ou des lymphocytes primaires (Cachat et al., 2013) (Figure 24). Un traitement unique à l'IFN-I exogène participe à la mise en place d'un phénotype antiviral pendant plusieurs semaines à la fois dans les PBMCs et les CBMCs et permet de diminuer le nombre d'intégrations provirales ou le nombre de cellules positives pour l'expression de la protéine de matrice p19 après coculture avec des cellules infectées par HTLV-1 (MT-2) irradiées (Macchi et al., 1990). Le pré-traitement de cellules Jurkat ou de lymphocytes

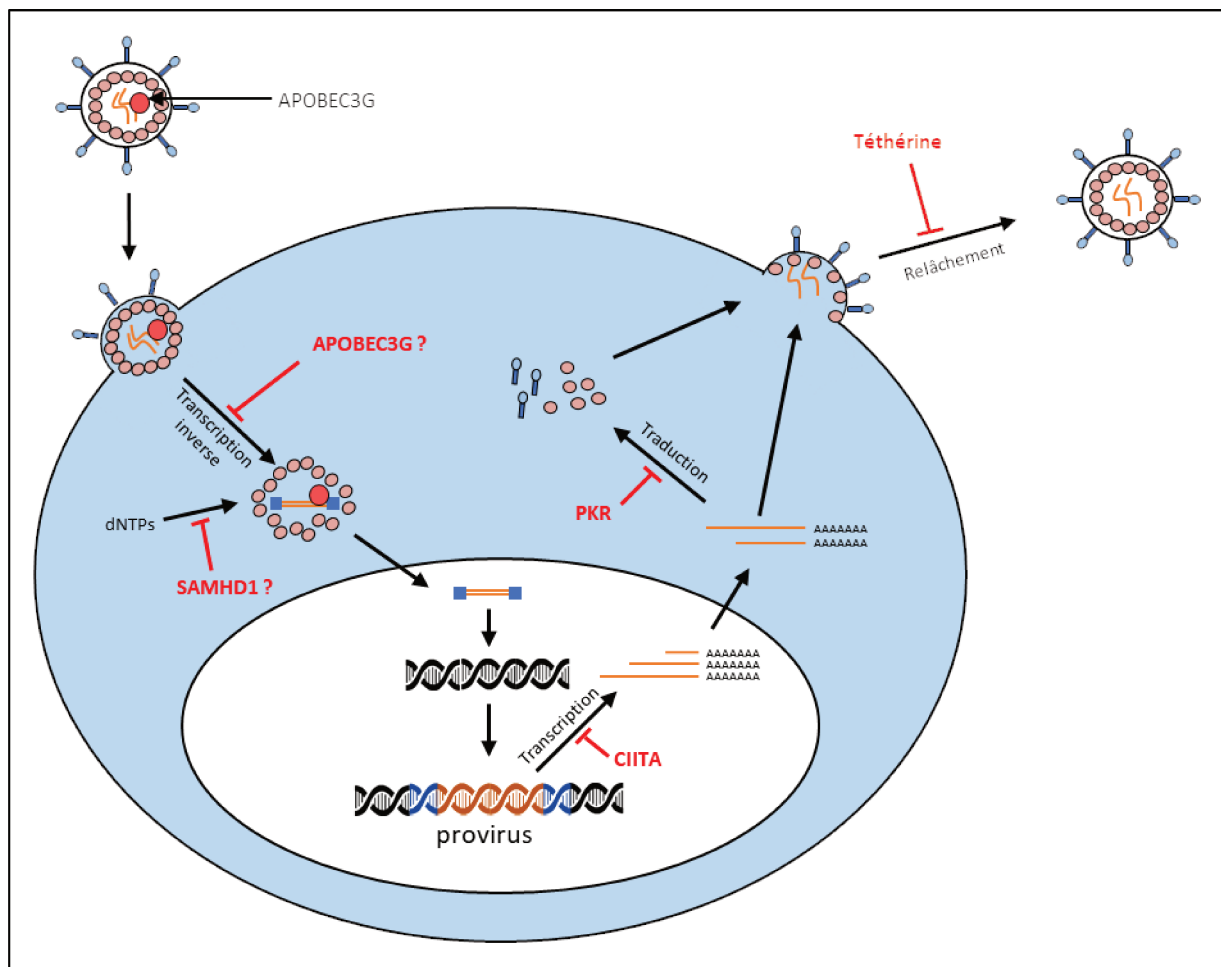
primaires activés avec de l'IFN- $\alpha$  limite leur infection par des cellules infectées par HTLV-1 ou HTLV-2, de manière dose-dépendante (Cachat et al., 2013). L'IFN- $\alpha$  n'inhibe pas les phases initiales du cycle viral, à savoir l'entrée virale, la rétrotranscription ou l'intégration, mais affecte ses phases tardives, puisque le traitement à l'IFN- $\alpha$  de cellules transfectées avec les clones moléculaires de HTLV-1 ou -2 (ce qui permet artificiellement de contourner les trois étapes indiquées ci-dessus), limite l'expression des protéines virales de capsid p24 et de Tax-1 et -2 (Cachat et al., 2013). L'IFN- $\alpha$  assure l'augmentation de l'expression de PKR (Protein Kinase R) et de sa forme phosphorylée. L'inhibition de l'expression de PKR abolit l'effet protecteur de l'IFN- $\alpha$  sur l'expression de la protéine de capsid p24 et de l'activation du LTR viral. Il ne semble pas que l'effet de l'IFN- $\alpha$  sur la réplication virale soit direct, via l'inhibition de l'activité transactivatrice de Tax, mais plutôt associé à une inhibition de son expression (Cachat et al., 2013). En effet, le traitement à l'IFN- $\alpha$  de lymphocytes T infectés dont la prolifération est dépendante de l'IL-2 (ILTs pour IL-2 dependent HTLV-1-infected T-cells) induit également une surexpression de PKR et une diminution de l'expression de Tax. En présence d'un inhibiteur de PKR et d'IFN- $\alpha$ , il y a une restauration de l'expression de Tax (Kinpara et al., 2013). En dehors de l'expression de PKR et de la diminution de l'expression de Tax, le traitement à l'IFN- $\alpha$  des ILTs induit une diminution de leur lymphoprolifération, une diminution de l'activité NF- $\kappa$ B et une augmentation de la mortalité (activation de la réponse p53), qui sont d'autant plus renforcées lorsqu'une combinaison avec de l'AZT est utilisée (Kinpara et al., 2013). Outre l'addition d'IFN- $\alpha$  exogène sur les lymphocytes infectés par HTLV-1, il a également été observé que la coculture d'ILTs avec des cellules stromales, telles que les HEK293T (Human Embryonic Kidney 293T) par exemple, diminue l'expression de l'ARNm de gag et l'accumulation de la protéine de matrice p19 dans le surnageant de culture. L'inhibition de l'expression de l'ARNm de gag est associée à l'expression d'IFN-I, et plus précisément d'IFN- $\beta$  par les cellules stromales (**Figure 24**). La coculture d'ILTs avec des cellules MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) IRF7  $-/-$  ne réprime plus l'expression de l'ARNm de gag et tend même à augmenter son expression. Enfin, 16h après leur injection par voie péritonéale dans des souris IRF7  $-/-$ , ces ILTs présentent une meilleure expression de l'ARNm de gag, ce qui suggère que la suppression de l'expression de HTLV-1 in vivo, du moins dans les phases initiales, se déroule par un mécanisme dépendant d'IRF7 (Kinpara et al., 2009).



**Figure 24** : Effets de l'IFN- $\alpha$  exogène dans le contexte de l'infection par HTLV-1. L'IFN- $\alpha$  induit la mise en place d'un état antiviral et prévient l'infection des lymphocytes par HTLV-1. Sa fonction est ambivalente au niveau des cellules déjà infectées. En effet, si l'IFN- $\alpha$  est capable de réduire l'expression des protéines virales après traitement des ILTs, ses effets sont moindres sur les lignées transformées par HTLV-1. L'IFN-I produit par les cellules stromales suffit à reproduire l'effet de l'IFN- $\alpha$  exogène sur les ILTs.

Les études présentées ci-dessus s'accordent à indiquer que l'inhibition de l'infection des lymphocytes par HTLV-1 après une stimulation à l'IFN- $\alpha$  est véhiculée par le facteur de restriction PKR. De manière générale, l'IFN- $\alpha$  est capable d'induire l'expression de plusieurs facteurs de restriction capables d'inhiber la progression dans le cycle viral. La fonction de ces molécules a cependant été peu caractérisée dans le contexte d'une infection par HTLV-1, la plupart n'ayant pas ou peu d'activité antivirale envers ce dernier. Par exemple, alors que le facteur SAMHD1 (SAM domain and HD domain-containing protein 1), en agissant sur la déplétion du pool de nucléotides nécessaires au mécanisme de rétrotranscription, induit l'apparition d'intermédiaires de réplication de HTLV-1 responsables d'un cycle viral abortif au sein des monocytes (Sze et al., 2013), la fonction de SAMHD1 lors de l'infection virale par HTLV-1 reste cependant controversée. D'une part l'infection de MDDCs (Monocyte-Derived Dendritic Cells) par des cellules infectées par HTLV-1 n'est pas améliorée lorsque les MDDCs expriment Vpx, un inhibiteur de SAMHD1 (Gramberg et al., 2013). D'autre part, l'IFN- $\alpha$  n'inhibe pas les étapes du cycle viral de HTLV-1 comprises entre l'entrée et l'intégration virale dans les lymphocytes (Cachat et al., 2013), comme déjà mentionné ci-dessus. De même, tandis que certaines études mettent en évidence que la protéine APOBEC3G (Apolipoprotein B

mRNA-editing Enzyme Catalytic polypeptide-like 3G), une désaminase à l'origine de mécanismes d'édits nucléotidiques lors de la rétrotranscription et qui est présente dans les particules virales de HTLV-1, n'affecte pas ou très peu la capacité infectieuse des virions (Ohsugi and Koito, 2007 ; Navarro et al., 2005 ; Mahieux et al., 2005), d'autres observent l'opposé (Derse et al., 2007 ; Sasada et al., 2005). La divergence de ces résultats pourrait être le reflet de la quantité de protéines APOBEC3G produites à l'issue de la transfection (Ohsugi and Koito, 2007 ; Navarro et al., 2005 ; Derse et al., 2007 ; Sasada et al., 2005). Si l'expression de la tétherine inhibe le relâchement et de ce fait l'infectiosité des particules virales libres de HTLV-1, elle n'affecte pas ou peu la transmission du virus par un contact cellule-cellule pour des niveaux d'expression similaires à ceux induisant une diminution de l'infectiosité du virus libre de plus de 90 % (Ilinskaya et al., 2013). Il est intéressant de noter que HTLV-1 peut utiliser les fonctions de la tétherine à son avantage, puisque l'accumulation de particules virales à la membrane plasmique peut contribuer à l'efficacité du mécanisme de la transmission virale par un contact cellule-cellule. Enfin, le facteur de transcription CIITA (Class II Transactivator), qui permet l'expression du CMH-II, possède des propriétés antivirales puisqu'il inhibe la réplication de HTLV-1 et HTLV-2 (Pour revue : Forlani et al., 2013). Ce mécanisme inhibiteur est médié par l'inhibition de la translocation des protéines Tax-1 et Tax-2 du cytoplasme vers le noyau et la suppression de leurs capacités transactivatrices sur le LTR viral. En résumé, si peu de facteurs de restriction semblent vraiment efficaces pour inhiber le cycle viral de HTLV-1 dans les lymphocytes in vitro (PKR et CIITA) (**Figure 25**), il est possible que ces facteurs n'aient pas de réel impact in vivo. De plus, certains ISGs ont des activités provirales. C'est notamment le cas d'ADAR1 (Adenosine Deaminase Acting on RNA 1), qui a une action antagoniste à PKR (en limitant sa phosphorylation) (Cachat et al., 2014).



**Figure 25** : Cycle viral de HTLV-1 et facteurs de restriction. Les facteurs de restriction CIITA, PKR et téthérine inhibent respectivement les étapes de transcription des gènes viraux, de traduction et de relâchement des particules virales. La fonction des facteurs APOBEC3G et de SAMHD1, qui inhibent tous deux le processus de rétrotranscription par deux mécanismes différents, reste controversée dans l'infection des lymphocytes. **Adapté de Martin et al., 2016.**

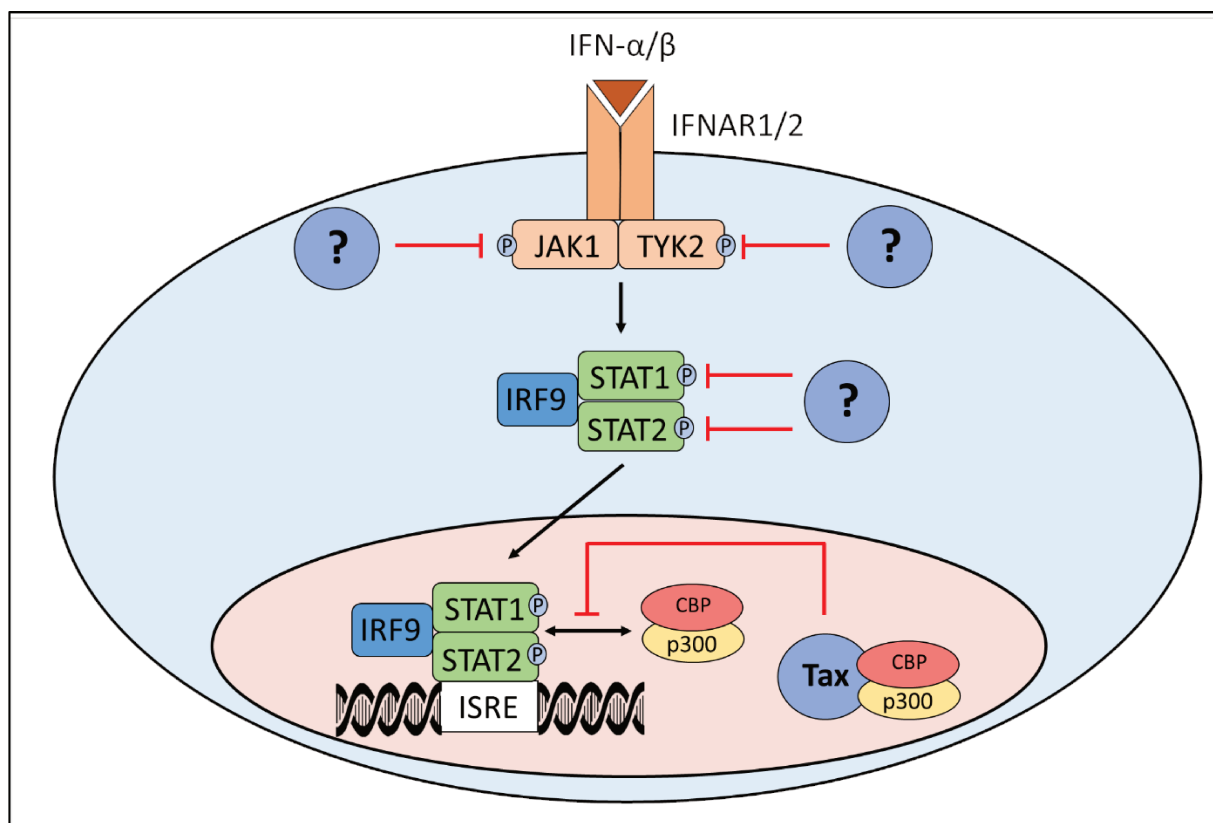
Enfin, l'impact de l'IFN- $\alpha$  sur les lymphocytes T déjà infectés reste controversé puisqu'un traitement à l'IFN- $\alpha$  ne provoque pas de diminution de l'expression de Tax dans la lignée transformée par HTLV-1 Hut102, et n'induit qu'une diminution de l'expression de la protéine de matrice p19 dans le surnageant, potentiellement associable à une expression de la téthérine, et donc une rétention des particules virales à la surface membranaire (Kinpara et al., 2013). De manière similaire, seul un traitement à l'IFN- $\alpha$  prolongé et répété de la lignée transformée par HTLV-1 MT-2 peut induire une diminution de la transcription virale (D'Onofrio et al., 1992), suggérant une meilleure capacité des cellules transformées à résister à l'effet antiviral de l'IFN- $\alpha$  (**Figure 24**). Les cellules infectées échappent probablement à l'action de l'IFN- $\alpha$  via l'inhibition de sa signalisation.



### 4.6.3. Altérations de la signalisation IFN-I

La transfection du clone moléculaire de HTLV-1 (c'est-à-dire l'intégralité du génome de HTLV-1) dans des cellules HEK293T inhibe l'activation des promoteurs contenant des séquences ISRE après l'ajout d'IFN- $\alpha$  ou - $\beta$ , et par conséquent l'expression des ISGs (Feng and Ratner, 2008). Cette inhibition n'est pas liée à une diminution de l'expression du récepteur IFNAR1 à la surface des cellules infectées (Smith et al., 1999), mais semble néanmoins associée aux étapes précoces de la signalisation de l'IFN-I, puisque le traitement de PBMCs ou de HEK293T transfectées par le clone moléculaire de HTLV-1 avec de l'IFN- $\alpha$  ne permet pas une phosphorylation efficace de JAK1, TYK2, STAT1 ou STAT2 (Olière et al., 2010) (Figure 26). Une inhibition de la phosphorylation de la protéine STAT1 suite à la stimulation avec de l'IFN- $\beta$  est également observée dans des lymphocytes infectés issus de patients HAM/TSP, en comparaison de lymphocytes non infectés issus des mêmes patients (Smith et al., 1999). Si l'infection par HTLV-1 est capable d'inhiber les étapes précoces de la signalisation de l'IFN-I, le mécanisme moléculaire de cette inhibition n'a quant à lui pas été élucidé. En revanche, la transfection d'un plasmide permettant l'expression de Tax dans des cellules HEK293T ou Jurkat induit également une inhibition de l'activation des promoteurs contenant des séquences ISRE après l'ajout d'IFN- $\alpha$  ou - $\beta$ , ce qui suggère que la protéine Tax seule peut inhiber la signalisation de l'IFN-I (Charoenthongtrakul et al., 2011 ; Zhang et al., 2008), effet qui est perdu lorsque la protéine Tax est incapable d'interagir avec CREB (Feng and Ratner, 2008) (Zhang et al., 2008). Tax n'empêche pas la formation du complexe ISGF3 mais inhibe l'activité transactivatrice de STAT2, en se fixant au CBP/p300 (Zhang et al., 2008) (Figure 26). Tax modifie spécifiquement la voie JAK-STAT en réponse à l'IFN-I et n'a pas d'effet sur la signalisation de l'IFN- $\gamma$  (Zhang et al., 2008).

De manière générale, les virus ont développé diverses stratégies pour contourner la réponse IFN-I, afin de limiter la réponse antivirale. Outre l'inhibition de la signalisation de l'IFN-I, les virus peuvent également mettre en place des stratégies afin d'inhiber la production d'IFN-I ou d'éviter leur reconnaissance par les PRRs (Pour revue : Tomasello et al., 2014) (Pour revue : McNab et al., 2015).



**Figure 26** : Inhibition de la signalisation IFN-I par HTLV-1. HTLV-1 est capable d'inhiber la phosphorylation des protéines JAK1, TYK2, STAT1 et STAT2, le mécanisme précis n'étant pas déterminé et symbolisé par un point d'interrogation. La protéine Tax est également capable d'inhiber le recrutement des facteurs CBP/p300 par le complexe IRF9/STAT1/STAT2. **Adapté de Ivashkiv and Donlin, 2014.**

#### 4.6.4. Altérations de la production d'IFN-I

Des cellules transformées par HTLV-1 (MT-2 et MT-4) ne produisent pas d'IFN-β lorsqu'elles sont infectées par le virus Sendai au contraire de lignées lymphocytaires non infectées, ce qui suggère un effet inhibiteur de HTLV-1 sur la production d'IFN-β (Yuen et al., 2016). L'impact de HTLV-1 sur l'expression de l'IFN-β a été évalué à plusieurs reprises à l'aide d'une construction IFN-β-Luciférase transfectée dans des cellules HEK293T. L'activation du promoteur de l'IFN-β, qui peut être induite via la stimulation de TLR-3 avec du poly(I:C) (Polyinosinic-polycytidylic acid) ou la transfection de divers effecteurs de la voie de signalisation de l'IFN-β (STING, cGAS, TBK1, IKKε, IRF3), est inhibée par la protéine Tax (Yuen et al., 2016 ; Narulla et al., 2017 ; Wang et al., 2017a). Tax est capable d'interagir avec TBK1, ce qui contribue à inhiber la phosphorylation d'IRF3 et in fine la production d'IFN-β

(Yuen et al., 2016). Tax est également capable d'interagir avec STING et d'inhiber son ubiquitination, en plus d'interrompre son interaction avec TBK1, ce qui a pour conséquence une inhibition de la phosphorylation d'IRF3 dépendante de la signalisation via STING (Wang et al., 2017a). Enfin, Tax inhibe la dimérisation d'IRF3 (Yuen et al., 2016). L'inhibition de la dimérisation d'IRF3 est également observée après la transfection du clone moléculaire de HTLV-1 dans des lymphocytes primaires (Olière et al., 2010). En plus de limiter la phosphorylation d'IRF3, Tax peut favoriser sa dégradation via l'activité de la protéine SOCS1 (Suppressor of Cytokine Signaling 1). L'expression de Tax est corrélée avec celle de SOCS1 dans des cellules Jurkat transfectées avec un plasmide codant Tax, des lignées cellulaires infectées par HTLV-1 ou des PBMCs transfectées avec le clone moléculaire de HTLV-1 (Charoenthongtrakul et al., 2011 ; Olière et al., 2010). L'expression de SOCS1 favorise la réplication virale et inhibe la production d'ARNm d'IFN- $\beta$  dans la cellule infectée. SOCS1 interagit avec IRF3 et induit sa dégradation par le protéasome lorsque les deux protéines sont exprimées de manière exogène dans des cellules HEK293T. Cependant, un effet direct de SOCS1 sur la protéine IRF3 dans les lymphocytes infectés par HTLV-1 n'a pas été démontré expérimentalement mais suggéré (Olière et al., 2010) (**Figure 27**). SOCS1 est surexprimé dans les lymphocytes T CD4+ des individus infectés par rapport aux donneurs sains (Olière et al., 2010), son expression pouvant ainsi contribuer à l'échappement de la réponse antivirale.

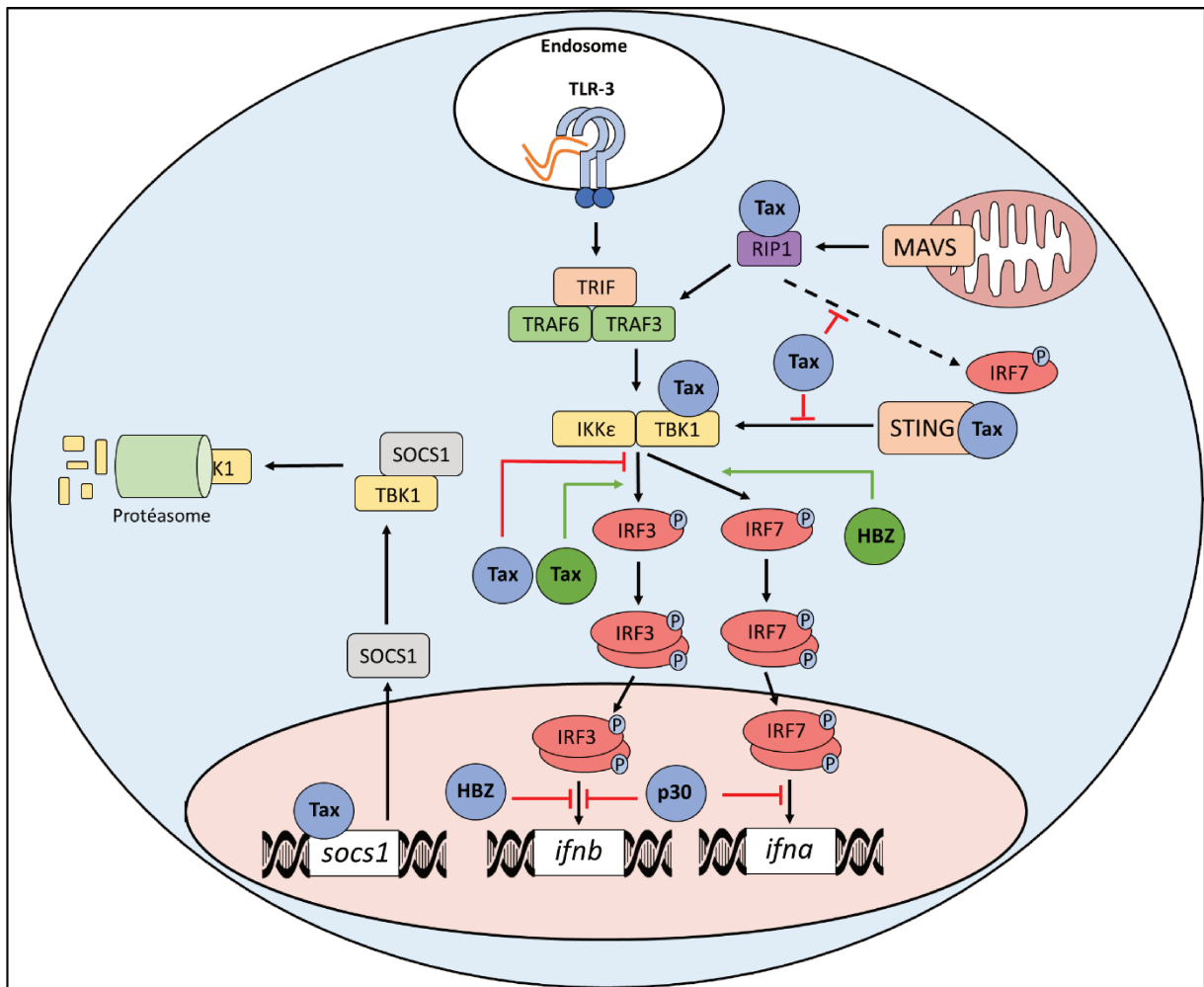
Trois études s'opposent cependant au schéma selon lequel Tax régule négativement l'activation d'IRF3. La première d'entre elles montre que la co-transfection de Tax avec TBK1 et/ou IKK $\epsilon$ , potentialise l'activation du promoteur de la construction IFN- $\beta$ -Luciférase dans des cellules HEK293T (Diani et al., 2015). La seconde indique que dans la lignée Hut102, qui est une lignée cellulaire transformée par HTLV-1 et produisant la protéine Tax de manière continue, la protéine IRF3 n'est pas sous-exprimée, l'expression de Tax favorisant par ailleurs sa phosphorylation (Suzuki et al., 2010). Enfin, la troisième montre que l'expression de Tax n'affecte pas l'activité de TBK1 et la dimérisation d'IRF3 (Hyun et al., 2015).

En conclusion, si des études montrent un effet de Tax activateur de la réponse IFN-I par le biais d'IRF3 (Suzuki et al., 2010 ; Diani et al., 2015), d'autres suggèrent un effet inhibiteur de Tax sur la réponse IFN-I par le biais d'IRF3 (Yuen et al., 2016 ; Olière et al., 2010) (Charoenthongtrakul et al., 2011 ; Narulla et al., 2017 ; Wang et al., 2017a) (**Figure 27**). Ces résultats contradictoires peuvent être liés aux différents modèles cellulaires utilisés dans ces études ainsi qu'aux niveaux d'expression de Tax dans les cellules transfectées, qui pourrait

alors avoir des fonctions différentes selon sa concentration. Cependant, il paraît plus probable que Tax contribue à l'inhibition de la réponse IFN-I, puisqu'il s'agit là d'un mécanisme favorable à la persistance virale. De plus, Tax inhibe de manière spécifique les activités de signalisation de RIG-I et de MDA5, d'autres senseurs capables d'induire la production d'IFN-I (Hyun et al., 2015). Ce mécanisme d'inhibition se fait grâce à la fixation par Tax d'une protéine en aval de la voie de signalisation : RIP1 (Receptor-Interacting Protein 1). Tax n'empêche pas l'association de RIP1 à RIG-I mais limite l'interaction entre RIP1 et IRF7, ce qui inhibe la signalisation IRF7 (Hyun et al., 2015) (**Figure 27**).

Si des études se sont intéressées aux effets de Tax sur la modulation des fonctions d'IRF3 ou d'IRF7, une seule étude s'est penchée sur le rôle de HBZ sur la modulation de ces deux facteurs. Tandis que Tax et HBZ ont des effets cumulés sur l'inhibition de l'activité transcriptionnelle d'IRF3, ces deux protéines présentent des effets antagonistes sur l'activité transcriptionnelle d'IRF7 (Narulla et al., 2017). En effet, HBZ améliore l'activité transcriptionnelle d'IRF7 au contraire de Tax, qui l'inhibe. L'effet potentiateur de HBZ sur l'activité d'IRF7 passe par les activités de TBK1 et IKK $\epsilon$ . HBZ peut interagir avec IRF7 mais n'interagit pas avec IRF3. Par cette interaction, HBZ pourrait potentiellement stabiliser l'activité transcriptionnelle d'IRF7. HBZ n'empêche ni la phosphorylation et la dimérisation d'IRF3 (au contraire de Tax), ni ne limite sa translocation dans le noyau. Si son rôle spécifique dans l'inhibition de la signalisation IRF3 n'est pas totalement élucidé, HBZ pourrait avoir un effet inhibiteur au niveau transcriptionnel (**Figure 27**), avec la mise en place d'une compétition pour les facteurs CBP/p300. Ainsi, un effet cumulatif des protéines Tax et HBZ sur l'inhibition de l'activité d'IRF3 augmente potentiellement les capacités d'évasion de HTLV-1 à la réponse immunitaire.

Enfin, en plus des effets de Tax et HBZ, la protéine p30 inhibe l'expression d'ISGs après l'activation des senseurs TLR-3 ou TLR-4, respectivement par du poly(I:C) ou du lipopolysaccharide, dans des monocytes et des MDDCs. D'un point de vue moléculaire, p30 est capable d'inhiber l'initiation et l'élongation transcriptionnelle des gènes de l'IFN- $\alpha$  et de l'IFN- $\beta$  après la stimulation de TLR-3 ou -4 (Fenzia et al., 2014) (**Figure 27**).



**Figure 27** : Mécanismes d'inhibition et de stimulation de la production d'IFN-I par les protéines Tax et HBZ. La protéine Tax peut interagir avec la protéine TBK1 et inhiber l'activation d'IRF3 ou au contraire stimuler son activation en fonction des études. Tax interagit avec STING et RIP1 et inhibe leur signalisation sous-jacente. Enfin, Tax peut favoriser la dégradation de TBK1 par la stimulation de l'expression de SOCS1. HBZ inhibe l'activité transcriptionnelle du dimère d'IRF3 et stimule l'activation d'IRF7. La protéine p30 inhibe l'activité transcriptionnelle des dimères d'IRF3 et d'IRF7. Les protéines Tax, p30 et HBZ représentées en bleu ont des fonctions inhibitrices et les protéines Tax et HBZ représentées en vert ont des fonctions activatrices sur la production d'IFN-I, respectivement. **Adapté de Ivashkiv and Donlin, 2014.**

#### 4.6.5. Reconnaissance du virus HTLV-1 par des senseurs de l'immunité innée

Une réponse antivirale se met en place après l'entrée de particules virales de HTLV-1 dans les monocytes primaires humains *in vitro* (Sze et al., 2013). Cette réponse antivirale est caractérisée par une phosphorylation des protéines IRF3 et STAT1 et une induction de l'expression d'ISG56 et de RIG-I. En parallèle, la quantité d'ARN viral et de protéines de capsid p24 diminue au

cours du temps. L'infection de monocytes par HTLV-1 est abortive in vitro, puisque l'entrée du virus dans ces cellules induit leur apoptose, observée par l'expression accrue du facteur pro-apoptotique Bax (Bcl-2-Associated X protein) et des formes clivées des caspases 3 et 9. Le mécanisme d'apoptose est associé à l'activité du facteur de restriction SAMHD1, qui limite l'activité de rétrotranscription et favorise l'accumulation d'intermédiaires de rétrotranscription. Ces derniers peuvent être reconnus par le senseur d'ADN STING, ce qui conduit à l'expression accrue d'ISGs et de Bax, avant l'apoptose (Sze et al., 2013). L'apoptose est également induite après la transfection d'intermédiaires de rétrotranscription de HTLV-1 dans la cellule, en l'absence d'autres éléments viraux. D'une manière similaire à SAMHD1, les protéines Ku70 et IFI16 sont également capables d'inhiber la réplication virale et de favoriser la réponse antivirale innée dans les lignées de monocytes THP-1 mais également dans les monocytes primaires in vitro (Wang et al., 2017b ; Yang et al., 2018). L'inhibition de leur expression conduit à une réduction drastique de la phosphorylation de p65 et d'IRF3, ainsi qu'une inhibition de l'expression de l'IFN- $\beta$  et du TNF- $\alpha$  dans les monocytes, lorsque ceux-ci sont cultivés en présence de cellules infectées par HTLV-1. Ku70 et IFI16 sont également capables d'interagir avec des intermédiaires de rétrotranscription de HTLV-1 et avec STING. L'absence de STING ne permettant plus de voir les effets inhibiteurs de Ku70 et IFI16 sur la réplication virale et sur la régulation positive de la réponse antivirale, ces études suggèrent que ces deux protéines participent à la réponse antivirale dirigée contre HTLV-1 via l'activité de STING. En revanche, aucune étude sur l'implication de cGAS dans la reconnaissance des intermédiaires de rétrotranscription de HTLV-1 et la potentielle activation de STING n'a été menée. En dehors des monocytes, le virus libre de HTLV-1 peut également être reconnu par les pDCs, par l'intermédiaire de TLR-7 (Colisson et al., 2010). Des études supplémentaires sont requises pour savoir si HTLV-1 peut également être reconnu par d'autres populations cellulaires, mais également si les monocytes ou les pDCs sont capables de produire de l'IFN- $\alpha$  en réponse à l'infection par HTLV-1 in vivo. Les pDCs étant des cellules spécialisées dans la production d'IFN-I dans l'organisme, et au vu des propriétés de l'IFN-I à induire des phénotypes immunitaires inflammatoires ou immunosuppresseurs lors des infections virales chroniques (Pour revue : Snell et al., 2017), une altération de ces cellules dans le cadre de l'ATLL et/ou de l'HAM/TSP pourrait potentiellement contribuer au développement des deux maladies.

## 5. La cellule dendritique plasmacytoïde

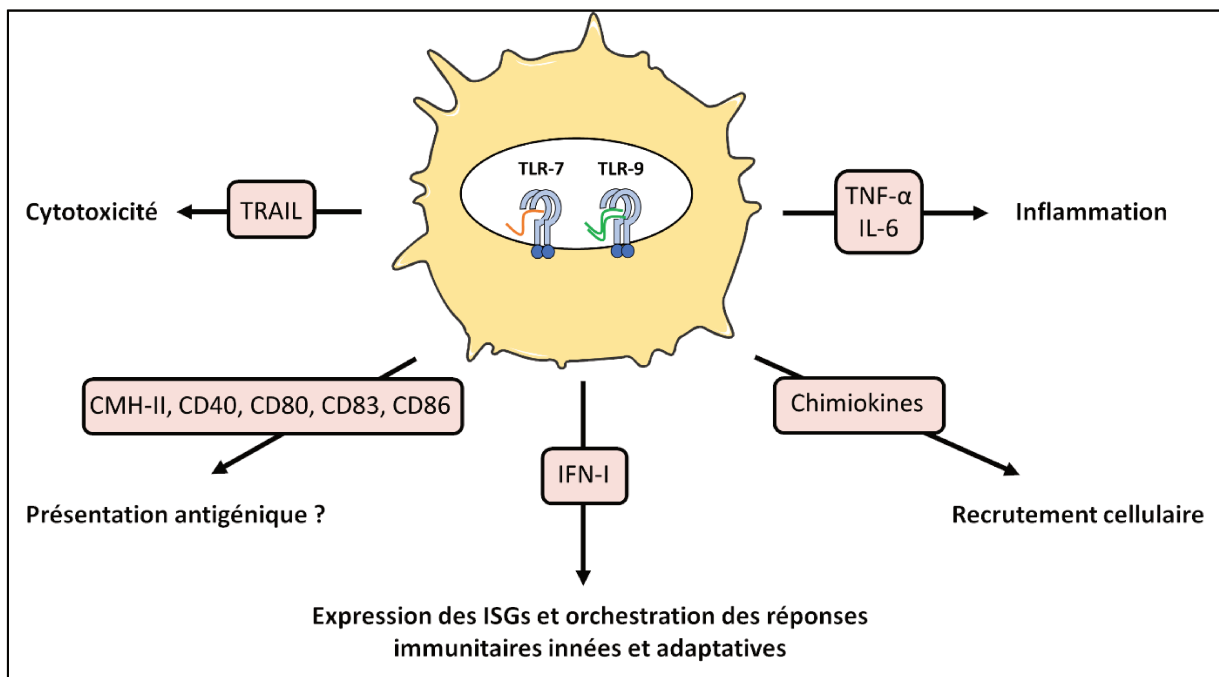
### 5.1. Ontogenèse et phénotype

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes et cellules dendritiques conventionnelles (cDC) sont issues d'un progéniteur de cellules dendritiques commun (CDP) (Pour revue : Collin and Bigley, 2018). L'orientation de la différenciation du CDP en pDC ou cDC repose sur deux facteurs de transcription antagonistes : E2-2 et ID2 (Inhibitor of DNA binding 2), le premier signant le développement des pDCs. Les pDCs sont caractérisées par l'expression de plusieurs marqueurs de surface : CD123, CD45RA et CD4, mais aussi des récepteurs qui sont intrinsèquement impliqués dans la régulation de leur fonction principale : la production d'IFN-I. Parmi eux, on retrouve BDCA-2 (Blood Dendritic Cell Antigen-2) (CLEC4C/CD303), BDCA-4 (NRP-1/CD304), ILT3 (Immunoglobulin-Like Transcript 3), ILT7, DCIR (Dendritic Cell Immunoreceptor), NKp44, FcεRI (High-affinity IgE receptor), DR6 (Death Receptor 6) ou encore CD300a/c (Pour revue : Collin and Bigley, 2018). Une étude récente a montré que les pDCs peuvent elles-mêmes être subdivisées en trois sous-populations en fonction de l'expression des marqueurs PD-L1 et CD80, après leur stimulation (Alculumbre et al., 2018). Ces trois populations ont des fonctions spécialisées dans la réponse immunitaire. Par exemple, la population PD-L1+ CD80- est spécialisée dans la production d'IFN-I.

### 5.2. Rôles

Les pDCs sont aptes à reconnaître des éléments viraux et à répondre à ces stimuli par la production rapide et en grande quantité d'IFN-I (Pour revue : Collin and Bigley, 2018) (Pour revue : Swiecki and Colonna, 2015). La reconnaissance des éléments viraux se fait principalement par TLR-7 et TLR-9. De plus, ces cellules sont capables de sécréter d'autres cytokines après stimulation, notamment des molécules pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6), et des chimio-attractants (CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 et CXCL10). Ces derniers peuvent attirer les lymphocytes T CD4+ et CD8+ activés au niveau des sites d'infections (Pour revue : Sozzani et al., 2010). Les pDCs peuvent également directement provoquer la mort des cellules infectées à travers l'expression de la protéine TRAIL (Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand) (Chaperot et al., 2006 ; Pour revue : Swiecki and Colonna, 2015). Enfin, les pDCs sont importantes pour ponter l'immunité innée et l'immunité adaptative, et notamment assurer les fonctions des lymphocytes T CD8+ et des cellules NK (Swiecki et al., 2010). À l'état basal, les

pDCs expriment des niveaux intermédiaires de molécules du CMH-II dont l'expression est augmentée après activation, en parallèle de marqueurs de co-stimulation, tels que CD40, CD80, CD83 et CD86 (Pour revue : Swiecki and Colonna, 2015) (Figure 28). S'il a été montré que ces cellules peuvent présenter des antigènes viraux aux lymphocytes T CD4+ (Pour revue : Villadangos and Young, 2008), des études récentes ont cependant mis en évidence que les pDCs ne peuvent pas polariser ou induire la prolifération des lymphocytes T CD4+ au contraire de leurs précurseurs directs (pre-DC) (See et al., 2017). Aussi, on peut supposer que les observations initiales étaient probablement associées à des contaminations de la population de pDCs par des pre-DCs, puisque ces cellules partagent des récepteurs en commun (CD123, CD303 et CD304), qui peuvent être utilisés pour l'isolation ou l'identification des pDCs par cytométrie.



**Figure 28** : Fonctions des pDCs. Après activation, les pDCs expriment des récepteurs en surface (TRAIL, CMH-II, CD40, CD80, CD83, CD86) et produisent plusieurs molécules (IFN-I, chimiokines, TNF- $\alpha$ , IL-6), définissant ainsi la multifonction des pDCs. La représentation de ces fonctions est non exhaustive. Adapté de Swiecki and Colonna, 2015.



### 5.3. Fonctions des pDCs dans le contrôle immunitaire

#### 5.3.1. Infection virale aigüe

La production d'IFN-I par les pDCs en réponse aux infections virales aigües est souvent limitée dans le temps et en termes d'amplitude. La sécrétion d'IFN-I par les pDCs apparaît lors des étapes précoces des infections systémiques par plusieurs virus, tels que MCMV (Murine Cytomegalovirus), VSV, LCMV, HSV1 (Herpes Simplex Virus 1) (Pour revue : Swiecki and Colonna, 2015). La déplétion des pDCs à l'aide d'un anticorps (anti-Ly6C/G) dans les souris inhibe la production d'IFN- $\alpha$  après leur infection par MCMV (Asselin-Paturel et al., 2001) (Krug et al., 2004). De plus, des souris MyD88  $-/-$  et TLR-9  $-/-$  présentent une susceptibilité accrue à l'infection par MCMV (Delale et al., 2005). In vivo, l'infection par RSV (Respiratory Syncytial Virus) dans un modèle murin induit le recrutement des pDCs dans les poumons, dont le nombre reste élevé jusqu'à la clairance de l'infection. La déplétion de ces pDCs réduit la clairance virale et entraîne une inflammation dans les tissus pulmonaires, les pDCs contribuant ainsi à la fois au contrôle de RSV et à la modulation des réponses immunitaires locales (Wang et al., 2006 ; Smit et al., 2006). Bien que plusieurs études montrent un rôle important des pDCs dans la production d'IFN- $\alpha$  et dans le contrôle viral dans les premiers instants de l'infection, d'autres ne montrent aucun effet de ces cellules. En effet, pour des virus qui ciblent les voies respiratoires, tels que RSV, NVD (Newcastle Disease Virus) ou Influenza, des études montrent que les pDCs, même si elles sont recrutées au niveau des poumons, ne jouent pas un rôle essentiel dans la production d'IFN- $\alpha$  ou dans la clairance virale (Jewell et al., 2007 ; GeurtsvanKessel et al., 2008 ; Kumagai et al., 2007 ; Wolf et al., 2009). De manière intéressante, deux études ultérieures montrent que les propriétés des pDCs dans le contrôle de l'infection virale semblent dépendantes à la fois de la taille de l'inoculum viral (Swiecki et al., 2010), et du lieu de réplication virale, localisé ou systémique (Swiecki et al., 2013). En effet, les pDCs sont capables de contrôler la réplication virale dans le foie, la rate et les glandes salivaires après l'inoculation d'une faible dose virale de MCMV. En revanche avec une dose virale élevée, les pDCs ne sont plus efficaces pour contrôler la réplication virale (Swiecki et al., 2010). De plus, tandis que les pDCs ne jouent pas un rôle dans le contrôle viral après une infection sous-cutanée par HSV, elles sont capables de produire de l'IFN-I, des cytokines inflammatoires et de stimuler les réponses de type Th1 lors d'une infection systémique par le même virus (Swiecki et al., 2013).

Ces différentes études menées pour comprendre l'importance des pDCs dans le contrôle des infections virales in vivo ont pour méthode d'inhiber la signalisation IFN-I (souris IFNAR -/-), de dépléter la population des pDCs déjà présente dans l'organisme par un anticorps ou de générer des souris déficientes pour la production de pDCs (à partir de leur précurseur). Il est donc possible que certains résultats puissent être attribués à l'apparition de mécanismes de compensation de la production d'IFN-I par les autres cellules immunitaires suite à la déplétion des pDCs. Récemment, un modèle de souris IRF3-/- IRF7-/- (Daffis et al., 2009) conservant néanmoins l'expression d'IRF7 dans les pDCs a été mis au point (Webster et al., 2018). Bien que le niveau d'IFN- $\alpha$  soit indétectable dans le plasma et la rate de ces souris après leur infection par le virus de la dengue (DENV), il y a cependant une expression des ISGs qui est conservée, au contraire de souris IRF3-/- IRF7-/- sans expression d'IRF7 dans les pDCs. Toujours par rapport aux souris IRF3-/- IRF7-/-, l'expression d'IRF7 uniquement dans les pDCs assure un contrôle viral, bien que moins précoce que dans des souris WT, avec une réponse IFN-II accélérée, qui dépend de la stimulation des cellules NK. Lors d'une infection par le virus du Chikungunya, les souris IRF3 -/- IRF7 -/- meurent rapidement, tandis que l'unique expression d'IRF7 dans les pDCs suffit à protéger les souris de cette mort rapide, avec un contrôle de la virémie. Ces résultats indiquent que l'expression d'IRF7 dans les pDCs, et par extrapolation leur capacité à produire de l'IFN-I, est suffisante pour contrôler l'infection par deux virus à ARN différents (Webster et al., 2018). L'utilisation de ce modèle de souris pourrait être utile pour définir la fonction précise des pDCs et déterminer si leur fonction suffit pour contrôler l'infection d'autres virus.

### 5.3.2. Infection virale chronique

L'infection chronique par HIV-1 est associée à une diminution de la fréquence des pDCs dans le sang, qui corrèle avec une charge virale élevée et un taux réduit de lymphocytes T CD4+ circulants (Pour revue : O'Brien et al., 2013). Les pDCs sont déplétées du sang, mais s'accumulent dans les nœuds lymphatiques et les tissus lymphoïdes de la muqueuse intestinale (Carranza et al., 2016 ; Li et al., 2014b ; Li et al., 2013 ; Pour revue : O'Brien et al., 2013). De plus, les pDCs résiduelles du sang sont moins sensibles à une stimulation de novo pour produire de l'IFN-I, tandis que les pDCs infiltrées dans les organes lymphoïdes ne présentent pas de déficience dans la production d'IFN-I (Pour revue : O'Brien et al., 2013). Il a été observé que les pDCs issues des contrôleurs élités, c'est-à-dire les individus infectés par HIV-1 qui contrôlent l'expansion de la virémie sans aucun traitement, produisent plus d'IFN- $\alpha$  après une

stimulation exogène que les pDCs issues des patients virémiques (Machmach et al., 2012). Chez les singes qui contrôlent l'infection par SIV, comme les mangabey enfumés (*Cercocebus atys*), la production d'IFN- $\alpha$  par les pDCs ex vivo, en réponse à une stimulation exogène, est très faible, voire nulle (Mandl et al., 2008), au contraire de celle des pDCs d'individus infectés par HIV-1 ou de macaques rhésus infectés par SIV-1. L'importance des pDCs dans la pathogenèse a également été observée dans des modèles d'infection de souris humanisées et déplétées en pDCs. Cette déplétion en pDCs limite la déplétion des lymphocytes T induite par l'infection par HIV-1 dans les organes lymphoïdes et conduit également à une expression réduite de l'IFN-I et des ISGs (Li et al., 2014a). Ainsi, deux cas de figures semblent favoriser le contrôle viral lors des infections par HIV/SIV : une conservation de la réactivité des pDCs (contrôleurs élités) ou une absence de leur réactivité (mangabey enfumé), tandis qu'un profil intermédiaire (patients virémiques et macaques rhésus) tendrait à favoriser la pathogenèse.

La perte de sensibilité des pDCs suite à un stimulus exogène peut être associée à un processus d'épuisement immunitaire. Chez les individus infectés par HIV-1, de nombreuses pDCs du sang expriment le marqueur TIM-3 (Schwartz et al., 2017 ; Font-Haro et al., 2018). Le nombre de pDCs exprimant TIM-3 corrèle positivement avec la charge virale de HIV-1. L'expression de TIM-3 par les pDCs diminue la production d'IFN- $\alpha$  après stimulation par des agonistes de TLR-7 ou -9. De plus, les pDCs qui expriment TIM-3 ont une expression constitutive d'IRF7 qui est réduite (Schwartz et al., 2017). Une thérapie antirétrovirale des individus infectés rétablit partiellement la fréquence des pDCs dans le sang, avec une diminution de l'expression de TIM-3 à leur surface. L'inhibition de l'expression de TIM-3 est positivement corrélée avec une diminution du niveau d'ARN de HIV-1 lors des périodes initiales de la thérapie antirétrovirale (Font-Haro et al., 2018). Dans la moelle osseuse de souris chroniquement infectées par des virus, l'IFN-I induit la génération de pDCs dysfonctionnelles à partir de leurs précurseurs (Macal et al., 2018), ce qui est intéressant puisque l'expression du marqueur TIM-3 peut être induit par de l'IFN- $\alpha$  exogène. En résumé, il est possible que la production d'IFN-I lors des infections aiguës et chroniques favorise l'atténuation de la fonction des pDCs, et notamment la production d'IFN- $\alpha$ , phénomène qui contribuerait à la pathogenèse. En plus des observations faites pour HIV-1, l'inhibition de la production d'IFN-I par les pDCs, suite à leur stimulation, est également observée pour d'autres virus. C'est le cas par exemple de HBV (Martinet et al., 2012 ; Woltman et al., 2011 ; Duan et al., 2004 ; Sukriti et al., 2016), bien que les différentes études ne montrent pas nécessairement une diminution de la fréquence des pDCs chez les individus infectés. Il semble que cette diminution d'expression de l'IFN-I par les pDCs soit

associée à une dysfonction des cellules NK et CD8+ circulantes (Duan et al., 2004 ; Martinet et al., 2012). De manière intéressante, l'utilisation d'un agoniste de TLR-7 favorise la production d'IFN- $\alpha$  par les pDCs et le contrôle de l'infection chronique par HBV (Bam et al., 2017 ; Buschow et al., 2018). La thérapie ciblant TLR-7 semble aussi être utile pour les individus infectés par HCV, et chez qui les pDCs sont également déficientes dans leurs fonctions (Dolganiuc et al., 2006 ; Funk et al., 2014). Les différentes infections virales citées ci-dessus présentent donc en commun une baisse de la fréquence des pDCs dans le sang, ce qui a également été observé chez les patients ATLL (Hishizawa et al., 2004) et HAM/TSP (Azakami et al., 2009 ; Manuel et al., 2013a) et qui a déjà été évoqué précédemment. De plus, les pDCs des individus infectés par HTLV-1 produisent moins d'IFN- $\alpha$  après leur stimulation que des pDCs de donneurs sains (Hishizawa et al., 2004).

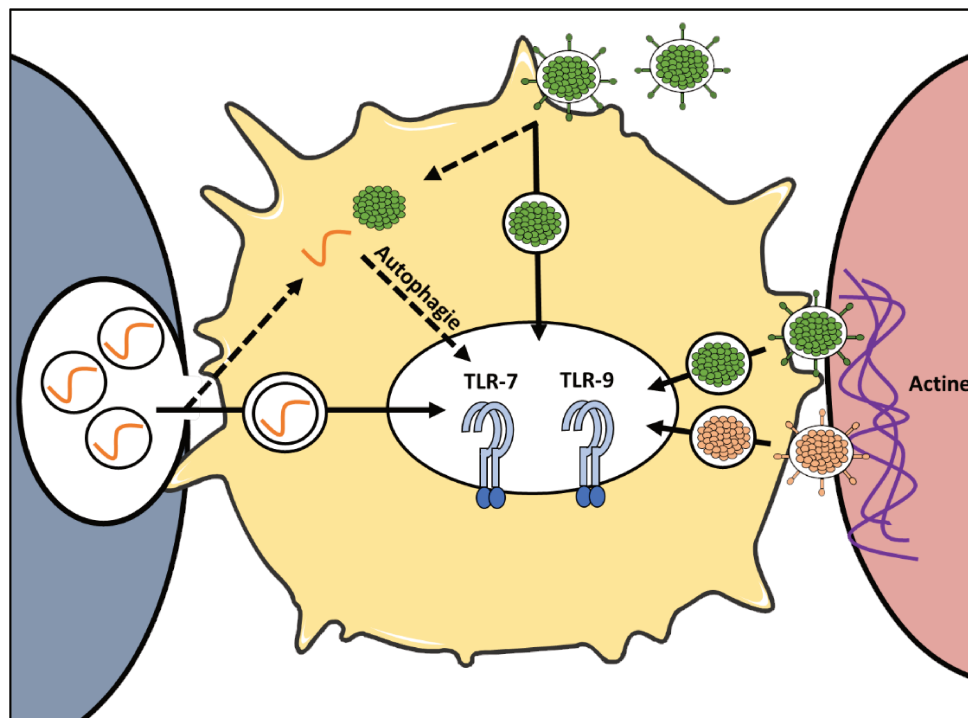
### 5.3.3. Activation des pDCs par les virus

Chez l'homme, les pDCs expriment uniquement TLR-7 et -9, ces molécules n'étant pas exprimées par les autres populations immunitaires. La reconnaissance de l'ARN simple brin par TLR-7 et de l'ADN non méthylé riche en CpG par TLR-9 donne la capacité aux pDCs de reconnaître une multitude de virus, majoritairement enveloppés (Feldman et al., 1994 ; Pour revue : Gilliet et al., 2008). Le virus doit être dirigé vers les endosomes pour que la production d'IFN- $\alpha$  après l'activation de TLR-7 ou -9 puisse avoir lieu. Si le mécanisme principal d'adressage des particules virales dans ces vésicules correspond à un mécanisme d'endocytose à la membrane plasmique, d'autres mécanismes, tels que l'autophagie, permettent de relayer du matériel génétique viral cytoplasmique dans ces endosomes (Lee et al., 2007) (**Figure 29**). De manière très rapide après la détection d'un virus, les pDCs vont consacrer une grande partie de leur machinerie transcriptomique à l'expression des gènes de l'IFN-I (Ito et al., 2006), ce qui leur permet de produire une grande quantité d'IFN-I en très peu de temps, et dans des proportions élevées, puisqu'elles produisent 200 à 1 000 fois plus de molécules d'IFN-I que chaque population immunitaire prise indépendamment. Après stimulation, les pDCs produisent majoritairement de l'IFN- $\alpha$  et en moindre mesure de l'IFN- $\beta$ . Cependant, s'il n'y a qu'une seule molécule d'IFN- $\beta$ , il existe 13 sous-types d'IFN- $\alpha$  différents. Bien que ces différents sous-types utilisent un récepteur unique pour induire une signalisation, ces molécules n'ont pas toutes le même effet biologique, à concentration équivalente, sur le contrôle viral. Il existe notamment une corrélation inverse entre la quantité d'un sous-type d'IFN- $\alpha$  produit après une stimulation de la pDC et sa capacité à inhiber l'infection de cellules par HIV-1 (Harper et al., 2015). En

effet, l'IFN- $\alpha$ 2, qui est pourtant le standard utilisé dans les thérapies à base d'IFN- $\alpha$ , réduit de manière modérée le titre infectieux et n'a pas d'effet sur l'inhibition de l'infection des cellules par HIV-1. Enfin, la composition relative des sous-types d'IFN- $\alpha$  produits peut aussi varier en fonction de la concentration initiale de virus, comme ce qui a pu être montré lors d'infections de monocytes (U937) par deux MOI (Multiplicity of infection) du virus Sendai (Zaritsky et al., 2015).

La reconnaissance d'un virus par la pDC ne nécessite pas que celui-ci soit infectieux. Cependant, une conformation optimale de l'assemblage des particules virales peut être requise, comme c'est le cas pour HCV (Grabski et al., 2015). Si les pDCs peuvent reconnaître de nombreux virus sous forme de particules virales libres, la reconnaissance directe de cellules infectées apparaît comme un mécanisme bien plus efficace pour l'activation des pDCs (Pour revue : Assil et al., 2015). L'induction efficace de cette réponse IFN- $\alpha$  après un contact physique entre la cellule infectée et la pDC a pu être observée pour différents virus phylogénétiquement éloignés, tels que HCV (Grabski et al., 2015), VSV (Frenz et al., 2014), YFV (Yellow Fever Virus) (Bruni et al., 2015), HIV (Lepelley et al., 2011), HAV (Hepatitis A Virus) (Feng et al., 2015), DENV (Décembre et al., 2014) ou encore HSV (Megjugorac et al., 2007). Le mécanisme d'activation des pDCs peut être dépendant ou non de l'expression de la protéine d'enveloppe virale. Par exemple, les cellules infectées par HCV ou LCMV sont capables de transférer des exosomes contenant des ARN viraux aux pDCs, ce qui est suffisant pour induire une production d'IFN-I par ces dernières (Dreux et al., 2012 ; Wieland et al., 2014) (**Figure 29**). Au contraire de ce transfert indépendant de l'expression de la protéine d'enveloppe virale, l'activation des pDCs par DENV nécessite l'expression de la protéine d'enveloppe virale, mais pas nécessairement d'une configuration mature des particules virales (Décembre et al., 2014) (**Figure 29**). Une protéine d'enveloppe mature pourrait contribuer à la fusion membranaire une fois la particule virale internalisée dans les vésicules acides de la pDC, ce qui libérerait le matériel génétique du virus dans le cytoplasme et limiterait sa reconnaissance par les TLR. Bien que le mécanisme d'entrée du virus lui-même soit moins bien décrit, les virus s'accumulent à l'interface entre les cellules infectées par DENV et la pDC (Décembre et al., 2014). Le cytosquelette d'actine s'accumule au site de contact entre la pDC et la cellule infectée, permettant ainsi de maintenir le contact entre les deux cellules, avant une potentielle internalisation du virus par endocytose (**Figure 29**). Dans le cadre de l'infection par le YFV, des filopodes établissent un lien physique entre la cellule infectée et la pDC (Bruni et al., 2015). De manière intéressante, le mécanisme d'entrée virale semble déterminer la voie de

signalisation par laquelle les pDCs produisent de l'IFN-I. Ainsi, l'ARN du virus libre de YFV est reconnu spécifiquement par le récepteur cytosolique RIG-I alors que l'ARN du virus transmis par une cellule infectée est reconnu par le récepteur endomembranaire TLR-7 (Bruni et al., 2015), ce qui témoigne de voies d'entrées dans la cellule qui sont différentes. Indépendamment du mécanisme de transmission du virus après un contact cellulaire, ce dernier pourrait favoriser une réponse locale, au niveau des sites d'infection, afin d'éviter la production d'IFN systémique et une réponse inflammatoire trop importante (Pour revue : Webster et al., 2016). De plus, des divergences dans les proportions relatives d'IFN- $\alpha$  et d'IFN- $\beta$  sécrétées par les pDCs peuvent varier, que le virus soit reconnu par la cellule infectée ou par le virus libre, comme observé pour VSV (Frenz et al., 2014).



**Figure 29** : Activation de la pDC par les virus. La pDC peut être activée après reconnaissance de particules virales libres, de particules virales délivrées après un contact cellulaire ou d'exosomes contenant de l'ARN viral. L'élément stimulateur est généralement véhiculé par endocytose vers les endosomes contenant les senseurs TLR-7 et -9, mais peut également être véhiculé depuis le cytoplasme par l'intermédiaire de mécanismes autophagiques. La pDC peut reconnaître des particules virales matures (en vert) ou immature (en rose), celles-ci se concentrant, en même temps que les filaments d'actine, au site de jonction entre la cellule infectée et la pDC (dans l'exemple du virus de la dengue). Adapté de Assil et al., 2015.

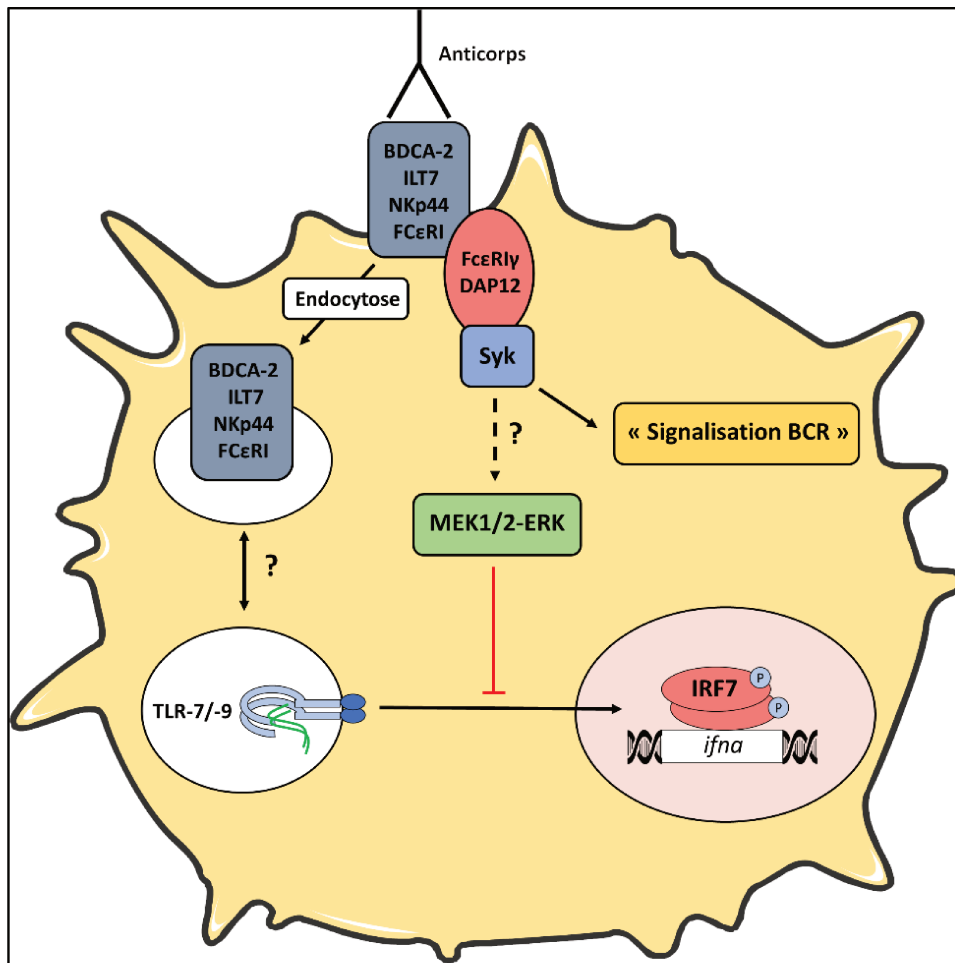
Une seule étude s'est intéressée au mécanisme d'activation des pDCs par HTLV-1 in vitro (Colisson et al., 2010). Cette étude montre que le virus libre de HTLV-1 est capable d'induire

la production d'IFN- $\alpha$  et de TNF- $\alpha$ , ainsi que l'expression de plusieurs récepteurs (TRAIL, CD40, CD83 et CD86) à la membrane plasmique. L'activation de la pDC se fait après endocytose et reconnaissance de l'ARN viral par TLR-7. L'importance du contact entre la pDC et une cellule infectée par HTLV-1 n'a en revanche pas été investiguée.

#### 5.4. Régulation de la réponse IFN-I induite par les pDCs

La réponse IFN-I se doit d'être régulée pour ne pas être excessive et provoquer une inflammation exacerbée. Hormis le rétrocontrôle négatif que peut exercer l'IFN-I lui-même sur sa production, notamment via la diminution de l'expression d'IFNAR en surface, l'expression des protéines SOCS1/3 qui inhibent la signalisation de l'IFN-I et via l'expression de miARN (Pour revue : [Ivashkiv and Donlin, 2014](#)), la pDC présente une série de récepteurs qui peuvent réguler négativement la réponse IFN-I après leur engagement, comme par exemple BDCA-2 ([Dzionek et al., 2001](#)), BDCA-4, CD123, ([Fanning et al., 2006](#)) ILT7 ([Cao et al., 2009](#)), NKp44 ([Fuchs et al., 2005](#)), LAIR-1 (Leukocyte-Associated Immunoglobulin-like Receptor 1) ([Bonaccorsi et al., 2010](#)), FC $\epsilon$ RI ([Schroeder et al., 2005](#)) ou encore DCIR ([Meyer-Wentrup et al., 2008](#)).

BDCA-2, ILT7, NKp44 et FC $\epsilon$ RI, sont associés à des adaptateurs membranaires, à savoir les protéines Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  ( $\gamma$  chains of the Fc $\epsilon$ RI) ou DAP12 (DNAX Activation Protein 12), qui assurent les fonctions de signalisation une fois le récepteur engagé avec son ligand (Pour revue : [Hirsch et al., 2017](#)) (**Figure 30**). Ces adaptateurs contiennent des domaines ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) dans leur région intracytoplasmique, dont les tyrosines seront phosphorylées suite à l'engagement du récepteur. Ces domaines ITAM serviront alors de plateforme pour le recrutement de plusieurs kinases : Syk (Spleen tyrosine kinase), BLNK (B-cell Linker protein) et BTK (Bruton's Tyrosine Kinase) qui phosphoryleront la protéine PLC $\gamma$  (Phospholipase C $\gamma$ ). Ceci aura pour conséquence l'activation de la voie des MAPK d'une part et la mobilisation d'un flux calcique dans la cellule d'autre part, ce qui est semblable à ce qui est observé après la signalisation via le récepteur des lymphocytes B (BCR). Cependant, le lien direct entre cette « signalisation BCR » et l'inhibition de la production d'IFN-I n'est pas totalement compris. Une étude récente a montré l'importance des protéines MEK1/2 (Mitogen-activated protein kinase kinase 1/2) - ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) dans l'inhibition de la réponse IFN-I ([Janovec et al., 2018](#)) (**Figure 30**).



**Figure 30** : Mécanisme de régulation de la production d'IFN-I après activation des récepteurs régulateurs à la surface des pDCs. L'activation des récepteurs BDCA-2, ILT7, NKp44 ou FCεRI induit une cascade de signalisation similaire à la signalisation du BCR, en plus de leur endocytose. L'activation de ces récepteurs inhibe la signalisation dépendante des TLR-7/-9, à travers l'activité des kinases MEK1/2-ERK. **Adapté de Hirsch et al., 2017.**

Si l'activation de BDCA-2 induit une phosphorylation rapide d'ERK et d'un de ses substrats, c-Fos, l'utilisation d'inhibiteurs de MEK1/2, permet de restaurer entièrement l'inhibition de la production d'IFN-I après l'engagement de BDCA-2. Enfin, le modèle d'inhibition semble plus compliqué encore puisqu'il a récemment été mis en évidence que Syk peut également contribuer de manière positive à la réponse IFN-I. En effet, un inhibiteur de Syk bloque la production de TNF- $\alpha$ , d'IL-6 et d'IFN- $\alpha$  de manière dose-croissante dans les pDCs après une induction avec du CpG ou du R848 (Resiquimod) (Aouar et al., 2016), agonistes respectifs de TLR-9 et TLR-7/-8. La protéine Syk est donc à la fois impliquée dans la réponse des récepteurs régulateurs et dans la réponse TLR. L'activation de la signalisation inhibitrice de cette réponse IFN-I nécessite une reconnaissance très avide entre les récepteurs régulateurs et leurs ligands.



La fixation des fragments Fab et F(ab')<sub>2</sub> sur BDCA-2 n'est pas suffisante pour induire une signalisation, au contraire de l'anticorps monoclonal entier (Pour revue : Hirsch et al., 2017). L'utilisation d'un anticorps dirigé contre BDCA-2 est capable, d'une part d'inhiber la production d'IFN- $\alpha$  après l'activation des TLRs par plusieurs stimuli, comme par exemple le virus Influenza, du sérum de patients avec un lupus érythémateux ou des analogues synthétiques R848 ou CpG (Dzionic et al., 2001 ; Pellerin et al., 2015), et d'autre part d'induire l'internalisation de BDCA-2 dans des compartiments vésiculaires (Pellerin et al., 2015) (**Figure 30**). La rétention intracellulaire de BDCA-2 peut être très longue (mesurée jusqu'à 24h avec des concentrations saturantes d'anticorps) et est visible aussi bien in vitro, qu'ex vivo, après l'inoculation de macaques avec un anticorps monoclonal dirigé contre BDCA-2 et l'observation de son internalisation après la récupération des pDCs circulantes (Pellerin et al., 2015).

DCIR a une région cytoplasmique contenant un domaine ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) (Pour revue : Bermejo-Jambrina et al., 2018). Ce domaine peut interagir avec les phosphatases SHP1/2 (Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase) et SHIP (Src homology 2 domain containing inositol 5-phosphatase). L'utilisation d'un anticorps anti-DCIR conduit à une baisse d'expression de l'IFN- $\alpha$  (et également de TNF- $\alpha$ ) après une stimulation au CpG, sans modification de l'expression des marqueurs CD40, CD80 et CD86 et de l'expression d'IL-6. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre DCIR conduit aussi à son internalisation, dépendante de la clathrine (Meyer-Wentrup et al., 2008).

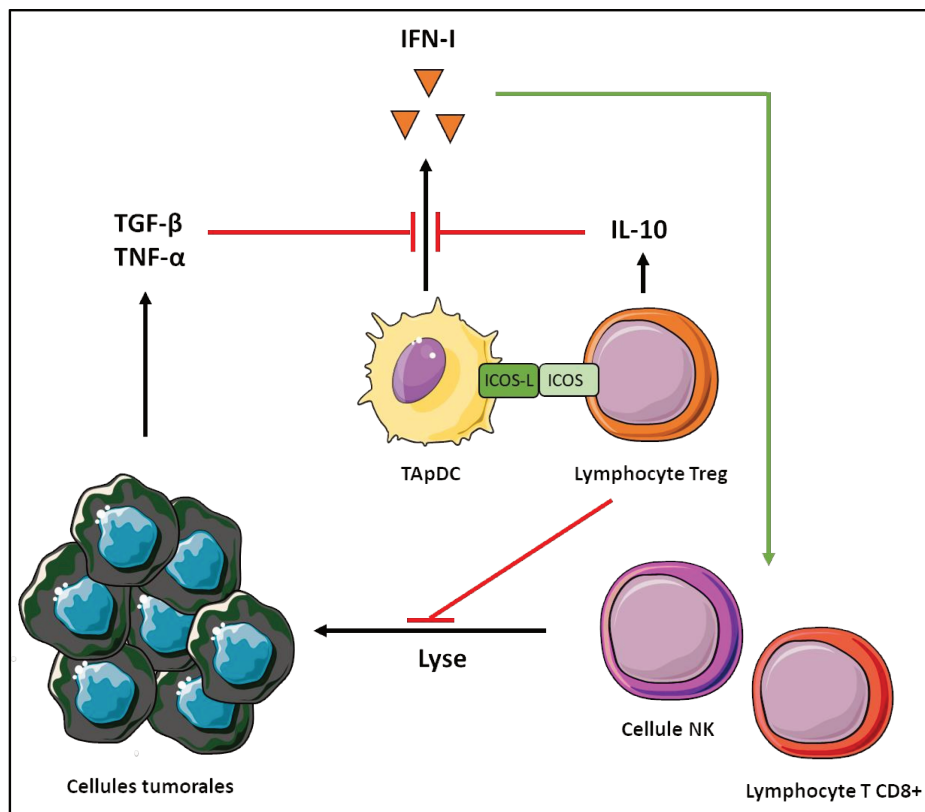
DCIR, comme BDCA-2, est un CLR. Ce sont des récepteurs qui présentent une région extracellulaire capable de reconnaître des carbohydrates, et plus précisément des structures glycosylées (Bloem et al., 2014), qui peuvent être portées par les pathogènes, les bactéries commensales ou les glycoprotéines du soi. Lorsqu'il est exprimé sous forme libre, DCIR fixe principalement les structures Man<sub>3</sub> (Mannotriose) et Lewis<sup>b</sup>, cette fixation étant dépendante du calcium. Cependant, lorsque DCIR est exprimé par une lignée cellulaire, la fixation de ces structures glycosylées n'est plus observée (Bloem et al., 2013). La réduction ou l'élimination d'une glycosylation présente dans le CRD (Carbohydrate Recognition Domain) de DCIR améliore sa capacité à fixer les structures Man<sub>3</sub> et Lewis<sup>b</sup>. Pour autant, il n'y a toujours pas de fixation de Man<sub>3</sub> ou Lewis<sup>b</sup> sur le DCIR cellulaire, même en absence de glycosylation de DCIR (Bloem et al., 2013). Même si la fixation des sucres n'est pas visible, car probablement ponctuelle ou de faible affinité, et donc potentiellement perdue au cours de lavages cellulaires, il est intéressant de noter qu'un processus de déphosphorylation des tyrosines a lieu dans la

cellule après la fixation des sucres, suggérant ainsi que la signalisation via DCIR et les phosphatases sous-jacentes a néanmoins eu lieu (Bloem et al., 2013). En ce qui concerne le ligand naturel de BDCA2, des études ont montré une interaction entre le domaine extracellulaire de BDCA2 (qui contient le CRD) et des motifs glycosylés composés de galactoses terminaux (Jégouzo et al., 2015). Le meilleur ligand de BDCA-2 correspond au motif Gal $\beta$ 1-3/4GlcNAc $\beta$ 1-2Man (Galactose $\beta$ (1-3/4)N-acétylglucosamine $\beta$ (1-2)Mannose). Il s'agit ici du résultat optimal obtenu avec une expérience de fixation du CRD de BDCA-2 sur une colonne de glycans) (Jégouzo et al., 2015).

De par leur capacité à reconnaître des protéines glycosylées, BDCA-2 et DCIR peuvent également inhiber la réponse IFN-I après la reconnaissance de glycoprotéines virales. La protéine gp120 de HIV ou de SIV peut se fixer sur les pDCs via le récepteur CD4, et probablement via un CLR, puisque sa fixation est en partie dépendante du calcium. Si l'interaction directe entre gp120 et BDCA-2 n'a pas été physiquement démontrée, sa fixation sur des cellules qui expriment BDCA-2 (après transfection) est cependant accrue, ce qui suggère que gp120 peut être reconnue par BDCA-2 (Martinelli et al., 2007). DCIR est également capable de reconnaître gp120 (Bloem et al., 2014). La forme trimérique ou monomérique de gp120 (de HIV ou de SIV) inhibe la production d'IFN- $\alpha$  et - $\beta$  induite par les pDCs après une stimulation par du CpG ou HSV2. En outre, gp120 diminue l'expression de CD83 à la surface des pDCs, ainsi que la production de TNF- $\alpha$ , d'IL-6 et de CXCL10 dans le surnageant de culture, après leur stimulation in vitro. Enfin, gp120 inhibe l'activité cytotoxique des NK stimulés par les pDCs (Martinelli et al., 2007). En revanche, l'inhibition de la production d'IFN- $\alpha$  après la fixation de gp120 sur DCIR n'a pas été recherchée. De même, la protéine E2 de HCV est capable de fixer BDCA-2 et DCIR et d'induire une inhibition de la réponse IFN- $\alpha$  (Florentin et al., 2012), effet qui est inhibé lorsque E2 ne peut plus fixer ces récepteurs. De manière intéressante, ces deux protéines, gp120 et E2, sont capables d'induire la phosphorylation d'ERK après leur fixation sur BDCA-2 (Martinelli et al., 2007 ; Florentin et al., 2012), ce qui renforce le modèle impliquant ERK dans le mécanisme inhibiteur de la réponse IFN-I induit par BDCA-2 (Janovec et al., 2018). Enfin, l'antigène de surface du virus de l'hépatite B peut également induire une inhibition de la production d'IFN- $\alpha$  via une interaction avec BDCA-2 (Xu et al., 2009).

## 5.5. pDCs et cancer

Le recrutement des pDCs dans le micro-environnement tumoral est généralement associé à un mauvais pronostic et favorise la mise en place d'un processus d'immunosuppression (Pour revue : Demoulin et al., 2013 ; Treilleux et al., 2004). Les pDCs qui sont recrutées au niveau des sites tumoraux, aussi qualifiées de TApDCs (Tumor-Associated pDCs), produisent moins d'IFN- $\alpha$  après une stimulation de la signalisation TLR-9. On retrouve ces TApDCs dans plusieurs cas de cancers, tels que le cancer du sein, le cancer du foie, le cancer de la bouche et du cou ou le cancer ovarien par exemple (Sisirak et al., 2012 ; Pedroza-Gonzalez et al., 2015 ; Hartmann et al., 2003 ; Labidi-Galy et al., 2011). Il y a notamment une corrélation entre l'agressivité de la tumeur et la fréquence des TApDCs. De plus, la présence de ces TApDCs est corrélée avec la présence de lymphocytes Treg au niveau de la tumeur (Pedroza-Gonzalez et al., 2015 ; Sisirak et al., 2012 ; Huang et al., 2014). Les TApDCs sont capables d'induire la production d'IL-10 par les lymphocytes Treg ainsi que par les lymphocytes T CD4+ naïfs, via l'expression d'ICOS-L (Inducible T-cell Costimulator Ligand) (Faget et al., 2012 ; Pedroza-Gonzalez et al., 2015 ; Ito et al., 2007) (**Figure 31**), ce qui contribue au mécanisme d'immunosuppression et au développement tumoral. La réduction de la production d'IFN- $\alpha$  par les TApDCs après une stimulation pourrait également contribuer au développement tumoral, notamment par une perte de l'activité des cellules NK, qui contribuent normalement au contrôle antitumoral (Rautela et al., 2015). La diminution de la production d'IFN- $\alpha$  par les TApDCs repose sur l'exposition de ces cellules aux molécules produites par les cellules tumorales elles-mêmes, comme le TGF- $\beta$  et le TNF- $\alpha$  (Sisirak et al., 2013 ; Labidi-Galy et al., 2011), sans oublier l'effet immunomodulateur de l'IL-10 produit par les lymphocytes Treg (**Figure 31**). La déplétion des TApDCs par le biais d'anticorps diminue la croissance tumorale in vivo (Le Mercier et al., 2013). En revanche, l'injection intra-tumorale d'un ligand de TLR-7 induit une maturation des TApDCs, la production d'IFN-I et une orientation de la réponse immunitaire vers un phénotype Th1, ce qui a pour conséquence une régression tumorale (Le Mercier et al., 2013). Ainsi, la restauration de la production d'IFN- $\alpha$  par les pDCs participe au contrôle antitumoral. En général, seules les TApDCs présentent cette diminution de production d'IFN- $\alpha$  après une stimulation de la voie TLR-9, au contraire des pDCs de la circulation sanguine qui ne semblent pas affectées (Le Mercier et al., 2013).



**Figure 31** : Développement tumoral associé aux pDCs infiltrées dans les tumeurs. Les TApDCs expriment le ligand ICOS-L qui favorise la sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes Treg. Cette production d'IL-10, ainsi que la production de TGF-β et de TNF-α par les cellules tumorales, favorisent l'inhibition de la production d'IFN-α par la pDC. Le recrutement des lymphocytes Treg sur le site tumoral et la diminution de production d'IFN-I par les pDCs réduit le contrôle antitumoral médié par les cellules NK et lymphocytes T CD8+.

Il y a moins de pDCs dans la circulation sanguine des patients ayant développé un cancer du sein ou un cancer ovarien (Sisirak et al., 2012) (Labidi-Galy et al., 2011), ce qui corrèle avec l'accumulation des pDCs au niveau du site tumoral. De manière intéressante, il y a également une diminution de la fréquence des pDCs circulantes chez les patients avec un ATLL (Hishizawa et al., 2004) (Azakami et al., 2009) (Manuel et al., 2013a), les différentes études ne précisant cependant pas si cette baisse de fréquence est liée à une diminution de la génération des pDCs à partir de leurs précurseurs ou à une migration de ces cellules en dehors de la circulation sanguine. Il est possible que les pDCs de patients ATLL migrent vers des organes lymphoïdes, à l'intérieur desquels elles pourraient induire un phénomène d'immunosuppression qui contribuerait à la pathogenèse de l'ATLL, comme ce qui est observé pour les tumeurs solides.



# PROBLÉMATIQUE

## **1. Activation des pDCs par HTLV-1 et HTLV-2**

L'IFN-I est suffisant pour réduire l'expression des protéines virales dans les cellules infectées issues de patients et inhiber l'infection des lymphocytes par HTLV-1. Cependant, l'absence du contrôle de l'infection par HTLV-1 chez l'homme, qui se traduit notamment par la mise en place d'une infection chronique, suggère des dysfonctions de cette réponse IFN-I. Une inhibition de la fonction des pDCs, et notamment de la production d'IFN-I pourrait contribuer au développement des maladies associées à HTLV-1, d'autant que le traitement des patients ATLL ou HAM/TSP avec de l'IFN-I contribue partiellement à leur amélioration clinique. Si la fréquence et la fonction des pDCs peuvent être analysées chez les individus déjà infectés, il est difficile d'étudier la fonction de ces pDCs lors des étapes initiales de l'infection. In vitro, les pDCs peuvent produire de l'IFN- $\alpha$  après reconnaissance de particules virales libres de HTLV-1. Cependant, peu de particules virales sont présentes dans le plasma des individus infectés et la transmission du virus HTLV-1 entre une cellule infectée et une cellule non infectée requiert un contact physique. Ainsi, nous avons revisité le mécanisme d'activation des pDCs, en nous focalisant sur l'activation de ces dernières par les cellules infectées elles-mêmes. Nous avons également stimulé les pDCs avec des cellules infectées par HTLV-2, dans le but de comparer les mécanismes d'induction des pDCs par les deux virus. Puisque HTLV-2 est moins pathogène que HTLV-1, il est possible que la fonction des pDCs dans le contrôle des deux virus soit différente.

## **2. Immunophénotypage des cellules sanguines de patients HAM/TSP**

L'identification de biomarqueurs qui permettent de prédire ou de définir la pathologie viro-induite par HTLV-1 est nécessaire pour mieux appréhender, d'une part les mécanismes qui contrôlent la pathogenèse, et d'autre part la mise en place d'une potentielle stratégie thérapeutique. Des divergences de la réponse immunitaire entre les individus symptomatiques et asymptomatiques pourraient constituer de bons biomarqueurs, puisque l'ATLL et l'HAM/TSP sont notamment caractérisées par des réponses immunitaires atténuées ou exacerbées, respectivement. Nous avons donc évalué la fréquence de plusieurs populations de l'immunité innée et adaptative, ainsi que leur capacité à produire diverses cytokines à la suite d'une stimulation exogène, chez des patients HAM/TSP, des porteurs asymptomatiques et des individus sains. Nous avons notamment inclus la population des pDCs dans notre étude, afin de replacer leur importance dans la symptomatologie viro-induite.

# RÉSULTATS



## 1. Activation des pDCs par HTLV-1 et HTLV-2

### 1.1. Sensing of Cell-associated HTLV by Plasmacytoid Dendritic Cells is Regulated by Dense beta-Galactoside Glycosylation. Article soumis pour publication / Travaux en collaboration avec l'équipe de M. Dreux (CIRI, Lyon, France)

Dans le but d'analyser la réponse IFN-I induite par les pDCs après la reconnaissance des cellules infectées par HTLV-1 ou HTLV-2, nous avons ou non séparé physiquement les deux populations cellulaires et montré que la production d'IFN-I par la pDC est dépendante d'un contact direct avec une cellule infectée par HTLV-1 ou HTLV-2. Nous avons ensuite analysé les facteurs moléculaires impliqués dans cette production d'IFN-I. Nous montrons ainsi que la production d'IFN-I induite par HTLV-1 est médiée par TLR-7, n'est pas associée à la production d'exosomes par la cellule infectée, et s'avère dépendante de GLUT-1 mais indépendante de NRP-1. Le virus se concentre au site d'interaction entre la cellule infectée par HTLV-1 et la pDC, au sein d'une structure riche en carbohydrates, précédemment définie comme le biofilm viral. Nous avons donc voulu connaître l'impact de cette structure sur l'activation des pDCs, puisqu'elle a déjà été montrée comme importante pour la transmission du virus entre un lymphocyte infecté et un lymphocyte non infecté. Le biofilm viral, isolé mécaniquement des cellules infectées, est la structure minimale qui induit la production d'IFN-I par la pDC. La déplétion du biofilm viral de la surface des cellules infectées, par déplétion enzymatique, réduit la production d'IFN-I par la pDC. De plus, l'ajout d'héparine au moment de la coculture entre le biofilm viral et la pDC augmente la production d'IFN-I, suggérant que l'héparine contribue au pontage du biofilm viral sur la cellule cible. Après avoir mis en évidence l'élément stimulateur de la réponse IFN-I, nous avons testé si plusieurs lignées cellulaires, infectées soit par HTLV-1 (C91-PL, Hut102 et MT-2) soit par HTLV-2 (C19 et MO), étaient capable de stimuler la production d'IFN-I par la pDC. Si des différences de production d'IFN-I sont observées en fonction de la lignée cellulaire utilisée, celles-ci ne corrèlent ni avec le pourcentage de cellules conjuguées, c'est-à-dire le pourcentage de pDCs en contact avec une cellule infectée, ni avec le niveau d'ARN produit par les cellules infectées, élément reconnu par la pDC pour induire la production d'IFN-I. En revanche, elles corrèlent avec la capacité infectieuse des différentes lignées infectées, mesurée à l'aide d'une lignée lymphocytaire rapportrice de l'infection (Jurkat LTR-Luciférase). Parmi les lignées infectées testées, une en particulier induit une réponse IFN-I plus faible que les autres : la lignée C19, infectée par HTLV-2. De manière intéressante, la lignée C19 présente une augmentation de

l'expression du carbohydrate Gal $\beta$ (1-3)GalNAc (Galactose  $\beta$ (1-3) N-acétylgalactosamine), qui porte également le nom d'antigène TF (Thomsen Friedenreich). Le niveau d'expression de ce carbohydrate à la surface des lignées infectées corrèle négativement avec la production d'IFN-I par la pDC. Son exposition ou son masquage à la surface des cellules infectées diminue ou augmente la réponse IFN-I de la pDC, respectivement.

**Sensing of Cell-associated HTLV by Plasmacytoid Dendritic Cells is Regulated by Dense  
 $\beta$ -Galactoside Glycosylation**

Sonia Assil<sup>1\*</sup>, Nicolas Futsch<sup>1\*</sup>, Elodie Décembre<sup>1</sup>, Sandrine Alais<sup>1</sup>, François-Loïc Cosset<sup>1</sup>,  
Renaud Mahieux<sup>1</sup>, Marlène Dreux<sup>1,2#</sup> and Hélène Dutartre<sup>1,2#</sup>

<sup>1</sup> CIRI – Centre International de Recherche en Infectiologie, Univ Lyon, Université Claude  
Bernard Lyon 1, Inserm, U1111, CNRS, UMR5308, ENS Lyon, F-69007, Lyon, France.

\* Co-first authors

# co-senior author, co-corresponding.

<sup>2</sup>To whom correspondence should be addressed:

Marlène Dreux and Hélène Dutartre, CIRI, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon, France. E-mail:

[marlene.dreux@ens-lyon.fr](mailto:marlene.dreux@ens-lyon.fr)

[helene.dutartre@ens-lyon.fr](mailto:helene.dutartre@ens-lyon.fr)

**Abstract (148 mots)**

Human T Leukemia virus (HTLV) infection can persist in individuals resulting, at least in part, from viral escape of the innate immunity, including inhibition of type I interferon response in infected T-cells. Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are known to bypass viral escape by their robust type I interferon production. Here, we demonstrated that pDCs produce type I interferons upon physical cell-cell contact with HTLV-infected cells, yet pDC activation inversely correlates with the ability of the HTLV-producing cells to transmit infection. We showed that pDCs sense surface associated-HTLV present with glycan-rich structure referred to as biofilm-like structure, which thus represents a newly described viral structure triggering the antiviral response by pDCs. Consistently, heparan sulfate proteoglycans and especially the cell surface pattern of terminal  $\beta$ -galactoside glycosylation, modulate the transmission of the immunostimulatory RNA to pDCs. Altogether, our results uncovered a function of virus-containing cell surface-associated glycosylated structures in the activation of innate immunity.

**Author Summary (185 mots)**

Human T Leukemia virus type (HTLV) establishes persistent infections, leading to adult T-cell Leukemia, a life-threatening cancer in chronically-infected individuals. Viral persistence likely results from a failure of immune response to eradicate viral replication, at least in part, by viral escape from innate immunity, and notably via decreased production of type I interferons (IFN-I) by infected cells. Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are known as robust producer of IFN-I in response to virus stimulation, thus bypassing the viral mechanisms to evade pathogen-sensing pathways in infected cells. However, HTLV particles are not detected in biological fluids of infected individuals. Here, we demonstrate that pDCs produce IFN-I upon physical contact with HTLV-infected cells. We show that pDCs sense surface associated-HTLV present with glycan-rich structure, referred to as HTLV-biofilm-like structure. Importantly, the sensing

of infected cells by pDCs is modulated by the glycosylation pattern at the surface of infected cells. This newly ascribed regulation of innate immunity activation by cell surface-associated glycans might contribute to the differential activation levels of antiviral response to infected cells when their glycosylation profile is modified, such as for chronically infected cells or tumor cells.

## **Introduction**

Human T-Leukemia Virus type 1 (HTLV-1) infects over an estimation of 5-10 million people. HTLV-1 is mainly present in Japan, central Africa, Caribbean and South America [1,2]. After a long period of clinical latency, HTLV-1 infection leads, in a fraction of infected individuals, either to Adult T-cell Leukemia/Lymphoma (ATL) [3] an uncontrolled CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation of very poor prognosis, or to an inflammatory disorder named HTLV-1 Associated Myelopathy / Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) [4]. In chronically infected individuals, HTLV-1 provirus is mainly found in CD4<sup>+</sup> T-cells, yet infected dendritic cells (DCs) are also detected [5,6]. Their function is subsequently altered in vivo [6–8], thereby most likely contributing to viral pathogenesis.

Viral persistence leading to chronic infection and its associated diseases, implies that innate and adaptive immune responses fail to eliminate HTLV-1 infected cells, possibly because HTLV-1 has evolved efficient strategies to escape immune pathways [9]. Type-I interferons (referred herein to as IFN-I, i.e., IFN $\alpha$  and  $\beta$ ) are key mediators of innate immunity. They induce the expression of IFN-stimulated genes (ISGs) that suppress viral spread at different stages of the viral cycle, and stimulate the onset of adaptive immune responses. The IFN-I response is initiated via the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by pattern-recognition receptors (PRRs), including the Toll like receptors (TLRs) [10]. Like virtually all viruses [11], HTLV-1 inhibits several steps of the PRR-induced pathways [12–14], and as a consequence, blunts IFN-I induction and signaling [15,16], leading to very limited production of IFN-I by infected cells.

Because the acute phase of the infection is asymptomatic, very little is known regarding host innate responses in HTLV-1-infected individuals. Nonetheless, indirect evidence infers that the

IFN-I response exerts an antiviral action against HTLV-1. First, while not easily detectable in vivo [17], viral proteins expression is induced in T-lymphocytes isolated from infected patients when cultured ex vivo [18], likely as a result of the relief from in vivo repression. Consistently, culture of HTLV-1-infected cells with IFN- $\beta$ -expressing stromal cells represses viral protein expressions [18]. Second, exogenous IFN-I decreases viral protein translation in vitro, and protects lymphocytes from de novo infection [19]. Thus, IFN-I-mediated antiviral control of HTLV-1 infection is likely to occur in vivo. Nonetheless, the cell type that produces IFN-I during infection remains enigmatic.

Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) act as sentinels of viral infection, as they are the major IFN-I producers in vivo [20], being 1000-fold more potent for IFN-I production as compared to other cell types [20]. They predominantly recognize viral nucleic acids, i.e. single-stranded RNA and non-methylated CpG-containing DNA, by TLR7 and TLR9, respectively [21]. Cell-free HTLV-1 particles when added at high concentration were shown to induce IFN-I production by pDCs in vitro, in a TLR7-dependent manner [22]. Nonetheless, cell-free viruses are undetectable in the plasma of HTLV-1-infected individuals, which leaves open the question of the modality of pDC activation in vivo. Importantly, we and others recently revealed that cell-cell contacts are required for efficient pDC activation by evolutionary divergent RNA viruses belonging to distinct families, such as Flaviviridae, Picornaviridae, Arenaviridae, Retroviridae and Togoviridae [23–31]. Transfer of immunostimulatory viral RNAs from infected cells to pDCs were further shown to involve carriers in the form of non-infectious and/or non-canonical viral particles, including exosomes [25,27,29] and immature virus particles [24].

Interestingly, cell-cell transmission of PAMPs is reminiscent of HTLV cell-cell transmission [32], which is the only efficient way to infect new target cells. HTLV-1 viral transmission

occurs through the transfer of neo-synthesized HTLV-1 virions via virological synapse formed at the cell-cell contact [33], and/or infectious viral particles embedded at the surface of infected cells within an extracellular matrix components (ECM)-rich structure [34]. The latter are referred to as the HTLV-1 biofilm-like structure [34]. This HTLV-1 biofilm-like structure has been further defined as the minimal infectious structure allowing viral transmission [35]. Importantly, the role of the cell surface associated virus within biofilm-like structure in the activation of the innate immune response is still unknown.

Here, we demonstrate that the pDC-mediated IFN-I response requires physical contacts with HTLV-infected cells. Moreover, we show that HTLV-1 biofilm-like structure represents the minimal virally induced-structure able to trigger an IFN-I response by pDC, and thus recapitulating pDC activation induced by contact with infected cells. Further, comparison of a panel of HTLV1/2 infected cells reveals that pDC-mediated IFN-I response inversely correlates with the ability of the HTLV-infected cells to transmit infectivity and with their surface glycosylation pattern. Indeed, we showed that the density of terminal  $\beta$ -galactoside glycosylation at the surface of infected cells regulates IFN-I production by pDC. Altogether, our results highlight an unforeseen function of virus-containing cell surface-associated structures in the activation of pDCs by cell-cell contacts, as well as its fine-tuning by the glycosylation pattern at the surface of the sensed infected cells.



## Results

### **pDC IFN-I production induced by contact-dependent sensing of HTLV-1 infected cells**

We first determined the production of type I IFN (referred to as IFN-I) by PBMCs and pDCs upon recognition of infected cells as compared to cell-free virions present in supernatant (SN) of infected cell lines (**Fig 1**). pDCs, representing 0.2-0.5 % of total PBMCs, were isolated from healthy blood donors with >91 % of purity (**Fig 1A**, middle panel), consistently with our previous reports [24,25,30]. PBMCs or purified pDCs (referred to as responders) were co-cultured with HTLV-1 chronically infected cells, i.e., C91-PL cell line [36], (referred to as inducer). These HTLV-1-infected cells induced a potent IFN-I response by both PBMCs and purified pDCs, when in physical contact (**Fig 1B**). In sharp contrast, cell-free viruses present in the supernatant from HTLV-1-infected cells (approximately 10-25 ng/mL of the HTLV-1 capsid p19<sup>gag</sup>, i.e., representing the viral concentration reached in the supernatant of inducer cells at the time of coculture) failed to induce detectable level, or very low, of IFN-I production (**Fig 1B**, around 5 U/mL when detected, or below the detection limit).

Next, we tested the contribution of pDCs relative to other PBMC cell types in the IFN-I response to HTLV-1-infected cells. Depletion of pDCs from PBMCs (**Fig 1A**, lower panel) abrogated the response to HTLV-1 infected cells (**Fig 1B**). In contrast, pDC-depleted PBMCs and PBMCs produced comparable levels of IL-6 after LPS stimulation, confirming that pDC depletion did not impair PBMC responsiveness (**Fig 1C**). pDCs obtained from 27 donors reproducibly demonstrated robust IFN-I responses to HTLV-1-infected cells (**Fig 1D**; median value of 13 400 U/mL), albeit with some donor-to-donor variations. Together these results indicate that pDCs are the main, if not exclusive, IFN-I producers among PBMCs in response to the contact with HTLV-1-infected cells.

Next, we tested whether pDC sensing of HTLV-1 infected cells involves TLR7, a sensor of single-stranded RNA. Inhibition of TLR7 recognition using competitive inhibitor significantly decreased the IFN-I response to HTLV-1-infected cells (**Fig 1E**). The specificity of TLR7 inhibitor was validated by the inhibition of IFN-I production triggered by a TLR7 agonist but not by a TLR9 agonist, as expected (**Fig 1E**). These results suggested that pDCs sense HTLV-1-infected cells via TLR7, implying that HTLV-1 viral RNA is likely the immunostimulatory signal. Since IFN-I production by pDCs following incubation with cell-free viruses was not or barely detectable, we hypothesized that cell-cell contacts are required for pDC activation. We thus measured IFN-I production when pDCs were physically separated from HTLV-1-infected cells by a 0.4 $\mu$ m permeable membrane (**Fig 1F**, TW). The absence of physical contact between inducer and responder cells abrogated IFN-I production (**Fig 1F**). We controlled that pDC responsiveness was maintained in this experimental setting, as pDCs produced similar amounts of IFN-I upon TLR7 agonist stimulation when cultured in transwell chambers or not (**Fig 1F**). This demonstrated that pDC contact with infected cells is required to trigger IFN-I production.

Exosomes have been involved in the transfer of immunostimulatory RNAs to pDCs for other viruses [25,27,29,37] and HTLV-1 infected cells are known to produce exosomes [38]. To test whether exosomes involved in the transfer of the HTLV-1 immunostimulatory signals, we used the C8166 HTLV-1 cell line, which impaired for expression of the structural proteins Gag and Env and thus do not produce infectious viral particles [39], as confirmed by absence of infectivity transmission to Jurkat-LTR-Luc reporter cell line (**Fig 1G**). While C8166 HTLV1 cells retain the capacity to produce the Tax regulatory protein, and exosomes that contain several viral mRNAs [38], they failed to induce IFN-I production by co-cultured pDCs (**Fig 1G**). This inferred that the transmission of activating signal to pDCs likely requires Env gp46 and/or Gag mediated extracellular export of viral RNA, rather than exosomal export of viral

RNAs. Altogether, our results demonstrated that pDCs sense infected cells by cell-cell contact leading to robust IFN-I response via TLR7-induced signaling.

### **Role of HTLV receptors in the sensing of HTLV-infected cells by pDCs.**

The capture of HTLV-1 cell-free virus by target cells involved binding of Env gp46 to NRP-1/BDCA-4 [40] and then to Glut-1 [41]. The latter also serves as the receptor mediating fusion of HTLV envelope with the cellular membrane [42]. Both NRP-1/BDCA-4 and Glut-1 are readily expressed at the pDC surface (**Fig 2A**). We thus sought to determine the contribution of these receptors in the transfer of the activating signal from the infected cells to the pDCs. Previous reports showed that the binding of HTLV-1 Env gp46 to its receptors is mediated by the receptor binding domain (RBD; the first 215 amino acids of gp46), and can thus be out-competed by recombinant RBD [41]. Competition with recombinant RBD significantly reduced IFN-I production by pDCs (**Fig 2B**) and viral transmission (**Fig 2C**). This suggests that pDC sensing requires HTLV-1 Env binding to its receptor(s). RBD comprises residues that have been specifically involved in NRP-1/BDCA4 (i.e., at the position 90-to-94) and the 94-to-101 stretch known to be pivotal for Glut-1 binding [43]. Thus, it does not allow to discriminate between binding to NRP-1/BDCA-4 versus Glut-1. Nonetheless, binding of Env gp46 to NRP-1/BDCA4 can be prevented by addition of recombinant VEGF<sub>165</sub>, a known ligand of NRP-1/BDCA4 [40]. Competition with recombinant VEGF<sub>165</sub> did not prevent the IFN-I production by pDCs (**Fig 2B**) nor cell-cell viral transmission (**Fig 2C**), suggesting that NRP-1/BDCA-4 binding may not be involved in HTLV-1 transfer by cell contact. The effectiveness of VEGF<sub>165</sub> competition was confirmed by the expected reduction of the binding of cell-free HTLV-1 virion measured by flow cytometry detection of p19<sup>gag</sup> (**Fig 2D**), consistent with a previous report [40], whereas no competition by VEGF<sub>165</sub> was observed in co-culture experiments with Jurkat reported cells (**Fig 2D and S1 Fig**). VEGF<sub>165</sub> and RBD treatment did not impair the pDC IFN-

I response upon stimulation with a TLR7 agonist, thus ruling out non-specific effects of recombinant RBD and VEGF<sub>165</sub> on pDC responsiveness (**Fig 2B**). Altogether, these results suggested that both transmission of infection to target cells after cell-cell contact as well as HTLV-1 sensing by pDCs require gp46 interaction with at least Glut-1.

### **pDCs respond to HTLV-1 infected cells via sensing of the viral biofilm-like structure**

Previous reports showed that HTLV-1 virions are present at the cell surface embedded within carbohydrate-rich elements, referred to as a viral biofilm-like structure [34], and involved in the infectivity transmission [34,35]. Since pDCs respond to HTLV-1-infected cells upon physical contact, we first determined whether HTLV-1 biofilm-like structure was present at the contact site between pDCs and HTLV-1-infected cells. Confocal microscopy analyses of pDC in contact with C91-PL cells revealed that HTLV-1 Env gp46 accumulates at the pDC/infected cell interface, together with carbohydrate-rich elements, known to be present in the viral biofilm-like structure [34], as revealed here by WGA lectin staining (**Fig 3A**). Of note, Env gp46 and WGA clusters were co-localized at the contact site for most of the analyzed pDC/infected cell contacts (**Fig 3B**, approx. 85%), suggesting that cell contacts are preferentially oriented toward these specific biofilm-like structures, or inversely that the biofilm-like structures are preferentially positioned at the contact site.

Next, we determined whether HTLV-1 biofilm-like structures could trigger pDC response. pDCs were cultured in the presence of HTLV-1 biofilm-like structures, isolated from infected cells as previously described [35]. Virus concentration in isolated biofilm-like structures ranged from 23.5 to 31.6 ng/mL of p19<sup>gag</sup>, a concentration similar to that found in supernatant of infected cells. While cell-free virus containing supernatants failed to induce IFN-I production by pDCs (**Fig 1B**), isolated biofilm-like structures significantly activated IFN-I production by

pDCs (**Fig 3C**). This was specific to HTLV-1 infected cells, since similar isolation procedure from uninfected cells failed to activate the pDCs (**Fig 3C, cont.**), ruling out a putative non-specific activation by cellular debris. As expected, isolated biofilm-like structures from HTLV-1-infected cells transmitted infectious virions to target cells, (**Fig 3D**). To further confirm that pDCs sense HTLV-1 biofilm-like structures, HTLV-1 biofilm-like structure was depleted using metalloprotease that digest the extracellular matrix [44] as previously described [34]. The metalloprotease treatment of HTLV-1-infected cells decreased the levels of surface envelope gp46 compared to untreated cells, in association with a reduction in both IFN-I production by co-cultured pDCs and viral transmission to Jurkat-LTR-Luc reporter target cells (**Fig 3E-G**). Altogether, these results show that the HTLV-1 biofilm-like structure contains the immunostimulatory signal that triggers IFN-I production by pDCs.

### **Enhanced sensing of HTLV-infected cells by pDCs in conjunction with increased pDC-infected cell contacts**

Since HTLV-1 embedded in biofilm-like structure, but not cell-free virions induced pDC IFN-I response, we next sought to examine the elements present in the biofilm-like structure that contribute to viral transmission and subsequent pDC activation. HTLV-1 biofilm-like structures contain ECM components and linkers, including collagen, agrin and heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) [34]. As HSPGs are involved in cell-cell and cell-ECM interactions [45], we hypothesized that HSPGs present in HTLV-1 biofilm-like structure could favor cell-cell adhesion with pDCs. To test this hypothesis, we used heparin, a polyanionic glycosaminoglycan that mimics the sulfate groups of HSPGs and that could thus act as a bridge to increase the pDC/infected cell contacts via the HTLV-1 biofilm-like structure. The impact of heparin on the frequency of cell-conjugates formed between HTLV-1 infected cells and pDCs was analyzed by imaging cytometry (Image Stream X technology) (**S2A Fig**), as we

previously established [24]. This quantitative analysis revealed that heparin significantly increased the frequency of pDC-HTLV-1-infected conjugates (**Fig 4A**). Consistently, heparin significantly augmented pDC IFN-I production induced by HTLV-1 infected cells (**Fig 4B**). Importantly, heparin increased as well pDC activation induced by isolated HTLV-1 biofilm-like structures (**Fig 4B**). Similar results were obtained using blood samples from different donors (**S2B Fig**). HSPGs are known to act as attachment factors via an interaction with Env gp46 SU [46]. Nonetheless, similar heparin addition had no impact on the viral transmission using either isolated HTLV-1 biofilm-like structures or HTLV-1-infected cells (**Fig 4C**). This demonstrated that under those experimental conditions, heparin did not compete with HSPGs for HTLV capture. Altogether, these experiments suggested that heparin increases pDC/infected cell tethering as well as pDC transfer of the immunostimulatory signal from the isolated HTLV-1 biofilm-like structures and, likely as a consequence, pDC IFN-I response. Importantly, the absence of modulation by these heparin treatments of infectivity transmission to target cells highlighted that the transfer of the immunostimulatory signal to pDCs features distinct regulatory mechanism(s) as compared to the infectivity transmission to other cell types.

### **Sensing of HTLV-infected cells inversely correlates with viral transmission.**

Next, we sought to define the viral determinants and other cellular component(s) modulating the level of pDC response to infected cells, including the amounts of viral RNAs, cell contact efficiency and ability to transmit viral infectivity. To address these questions, we compared three HTLV-1 chronically infected cell lines (C91-PL, MT-2 and Hut102), known to produce different amounts of viral proteins [47] and two HTLV-2-infected cell lines (MO and C19). All HTLV-cell lines triggered IFN-I production by co-cultured pDCs, albeit at different levels ranking from lower to higher inducer cell lines, at the optimal pDC/infected cells ratios, as follows: C19, MO, C91, Hut102 and MT-2 cell lines (**Fig 5A**). Neither differences in the

amount of intracellular genomic RNA nor viral RNA released in the supernatant of infected cells was correlated to the observed differences in the induction of pDC IFN-I response (**Fig 5B-C and S3A-B Fig**). This suggests that the amount of RNA produced by the infected cells is not rate limiting for activation of pDCs.

Thus, we next assessed whether frequency of pDCs engaged in contacts with the different HTLV-infected cell lines regulated the intensity of pDC activation. The frequency of pDC conjugates with the different HTLV-infected cell lines was similar, except higher level for the HTLV-infected MO cell line (**Fig 5D**). Nonetheless, this higher frequency of cell conjugates with the HTLV-infected MO cell line did not translate into higher levels of IFN-I production (**Fig 5D**), suggesting that additional factor(s), other than pDC ability to establish contact with HTLV-infected cells, govern(s) the levels of pDC IFN-I response to HTLV-infected cells.

We thus tested whether variations of pDC induction by HTLV-infected cell lines might be explained by distinct mechanisms for viral capture by pDCs. Using C19 cells that induced the lowest pDC IFN-I production (**Fig 5A**), we showed that for both C91 and C19, the pDC response and viral transmission were significantly out-competed by recombinant RBD, but not by recombinant VEGF<sub>165</sub> (**S4A-D Fig**), suggesting that HTLV viral receptor usages are not likely responsible for the difference in pDC IFN-I response to the various cell lines.

As we showed that pDCs are activated by cell-cell contacts with infected cells via viral biofilm-like structures, we then compared the viral accumulation at the surface of the panel of HTLV-infected cell lines (**S4E Fig**). The p19<sup>gag</sup> proteins were detected as patch/cluster at the surface of all infected cells, suggesting that the pDC activation is not directly linked to an absence of virus accumulation at the surface of the different HTLV-infected cell lines.

We next asked whether the level of pDC activation by the HTLV-infected cell lines correlate with their ability to transfer infectious virions to target cells. Regressive exponential correlation analysis revealed that IFN-I production by pDCs was inversely correlated with the ability of infected cells to transfer infectious virions (**Fig 5E-F**, p-value = 0,011). Altogether these results indicate that the sensing of HTLV-infected cells by pDCs is not strain-specific, and, importantly, inversely correlated to infectivity transmission to alternative target cells. It thus implies that pDC activation is likely modulated by other features of the infected cells.

**Sensing of HTLV-infected cells by pDCs inversely correlates with the density of  $\beta$ -galactoside glycosylation at the HTLV-infected cell surfaces.**

Our results using heparin suggested that glycosylated proteins, especially HSPGs are involved in the tethering of HTLV-1 stimulating signals to the pDC surface and/or its transfer, resulting in increased pDC IFN-I production. The density of surface glycosylation, including HSPGs [48], is known to be cell type specific [49]. We thus first studied whether heparin could modulate the pDC IFN-I production induced by C19 infected cell line, as representative of the cell line with the lowest ability to induce pDC, and using C91-PL cell line as reference. Similar to C91-PL cell line (**Fig 4C and 6A**), the heparin treatment did not change the transmission of infectious virus by C19 cells (**Fig 6A**). Contrasting with C91-PL cells, the presence of heparin did neither significantly increase the frequency of pDC-C19 cell conjugates nor the levels of IFN-I production by pDCs (**Fig 6B-C**). These results suggested that difference of the cell surface glycosylation pattern between HTLV-infected cell lines might be pivotal for the intensity of pDC response.



To test this hypothesis, we quantified cell surface glycosylation using various lectins known to bind different terminal glycosylation patterns (**S5A Fig**). The staining by Peanut agglutinin lectin (PNA), which bind to oligosaccharide structures with terminal  $\beta$ -galactose residues on the different HTLV-infected inducer cells (**S5B Fig**) revealed that the amount of this type of surface glycosylation was inversely correlated to the magnitude of IFN-I production by co-cultured pDCs (**Fig 6D-E**). As opposed, the levels of PNA lectin staining at the surface of infected cells positively correlated with their ability to transmit viral infection to target cells (**Fig 6F**). Consistent observations were obtained by confocal microscopy analysis of PNA lectin, displaying very weak PNA staining for MT2 and Hut102, the highest IFN-inducer cell lines (**S5C Fig**). Similar trend was observed for stained SBA-lectin (**S5B Fig**), thought to detect  $\alpha$ - or  $\beta$ -linked N-acetylgalactosamine residues, albeit to with lower magnitudes of difference (**S5B Fig**), and without statistical correlation with IFN-I production (**S5D Fig**). In contrast, binding of the lectins UEIA, WGA and ConA, that recognized other glycosylated residues, did not demonstrate difference between the different cell lines (**S5B Fig**). Altogether, these results suggest that the composition of the terminal oligosaccharide residues, especially dense terminal  $\beta$ -galactose glycosylation, present at the surface of HTLV1-infected cell lines might inversely govern both IFN-I production by co-cultured pDCs and viral transmission.

To further study the role of terminal  $\beta$ -galactose residues in IFN-I induction, we performed assay to mask such surface glycosylation by pretreating C19 cells with PNA-lectin prior contact with pDC. The presence of PNA-lectin at the surface of C19 cells significantly increased pDC-induced IFN-I production (**Fig 6G**). Conversely, the removal of sialic acid using neuraminidase treatment resulted in augmented exposure of terminal  $\beta$ -galactose at the surface of treated C91 cells (i.e., at levels similar to that of C19 cells, **Fig 6H**), and significantly decreased of pDC-induced IFN-I production (**Fig 6G**). Altogether, our results show that  $\beta$ -galactoside

glycosylations at the surface of infected cells likely negatively regulate pDC activation by HTLV-infected cells

## Discussion

Evidences suggested that IFN-I response is likely pivotal to repress HTLV-1 replication [18,19,50,51]. Yet, the persistent HTLV infection is thought to result from escape viral mechanism and consequent failure of the immune detection and clearance of infection [52]. Along this line, HTLV-1 inhibits IFN-I induction and signaling [12–15] [16], leading to very limited production of IFN-I by infected cells. In this study, we elucidated an alternative sensing pathway mediated by the recognition of infected cells by pDCs, a sentinel cell type known to be a potent producer of IFN-I and refractory to most viral infection. We demonstrated that pDCs preferentially sense HTLV-1 infected cells via physical contact rather than HTLV-1 cell-free virions. This sensing pathway is thus congruent with the absence, or very low, detection of cell-free virus in the blood of infected patients [53], a consequence of active repression of viral expression [54]. Recent report suggested that viral latency observed in vivo might be transiently relieved under changes in nutrients availability in the extra-cellular environment of the infected cells [55], thus potentially leading to sporadic viral expression in privileged sites such as lymphoid organs. Thus localized IFN-I response by pDCs upon contact with transiently reactivated infected cells would be in agreement with the absence of detection of IFN-I at the systemic level in infected carriers [56].

HTLV-1 viral transmission through physical contact likely compensates for the low levels of cell-free viruses found in the patients and/or their poor infectivity [35,53,57]. Upon cell contact, the virus is transmitted either through a virological synapse, in which virus assembly and budding are polarized toward the cell-cell contact [58], or through the transfer of viral biofilm-like structures, an extracellular accumulation of viruses embedded in the infected-cell extracellular matrix (ECM) [34], both mechanisms being likely not mutually exclusive. Here,

we showed that isolated viral biofilm-like structure is sufficient to trigger IFN-I production by pDCs. We further propose that the increased potential of biofilm-like structures for pDC activation, as compared to cell-free virus, could be due to components of these structures favoring the transmission of the pDC-activating signal, possibly by tethering the immunostimulatory RNA carrier to the pDC surface.

Our results suggested that pDCs-sensing of HTLV-infected cell is mediated via the HTLV entry receptor Glut-1, and NRP-1/BDCA-4 receptor seems dispensable. Previous report showed that infection of myeloid DC by cell-free HTLV-1 particle is independent of NRP-1/BDCA4, viral binding being ensured by the DC-SIGN lectin [59]. It is conceivable that pDC-expressed glycosylated surface factors, including lectins and HSPGs known as capture molecules for HTLV and other viruses, could act as cofactor for HTLV capture at the pDC surface via glycan-mediated interactions with HTLV-1 before its delivery to Glut-1. In agreement with this assumption, our results showed that heparin, an HSPG mimic, increased IFN-I production by pDCs in response to HTLV-1-infected cells, and isolated HTLV-1 biofilm like structures implying a putative function of HSPG for the capture of the RNA immunostimulatory carrier by pDCs. In sharp contrast heparin has not impact on the pDC response to HTLV-2-infected cells. Consistent with earlier report showing the non-requirement of HSPG for cell-free HTLV-2 entry [60], this might implies that the putative capture function of HSPG at the pDC surface only applies for HTLV-1. Alternatively, the differential modulatory effect of heparin on pDC activation by HTLV-1- versus HTLV-2- infected cells could reflect a distinct composition of the extracellular matrix and/or cell surface expression of glycosylated proteins by these chronically infected cells.

Our results uncovered differences of surface glycan pattern of HTLV-infected cells, including the composition of the terminal oligosaccharide residues at the cell surface, with densification of certain residues being inversely correlated to the level of pDC IFN-I response. Further, enzymatic and pharmacological inhibition/modulation of the cell surface glycans impact pDC response to infected cells. These observations support the proposition that the extracellular matrix and/or glycosylated proteins expressed at the cell surface of the infected cells likely govern both IFN-I production by co-cultured pDCs and viral transmission, these two processes being inversely regulated.

By analogy to previously reported abilities of several viruses to modify ECM composition of the host cells to favor their own dissemination and/or immune escape [61–63], one might speculate that the chronic infection by HTLV modulates the cell surface glycan pattern [64]. We showed that terminal  $\beta$ -galactoside glycosylation signature is inversely correlated with the ability of infected cells to promote contact-dependent pDC IFN-I production. Along the same lines, heparin increases pDC contact with HTLV-1 infected cells, but not that with HTLV-2 infected cells, an observation in agreement with the ability of heparin to bridge surface glycan from different cells [65]. Together with the absence of correlation between the amount of viral RNA production by different HTLV-infected cells and pDC IFN-I production, our results suggest that composition of the extracellular matrix and/or cell surface expression of glycosylated proteins that embeds cell surface-attached viruses of the different HTLV-infected cells might regulate pDC activation.

Previous reports showed that pDC response to viral infections can be modulated by different cell surface factor including the regulatory receptors ILT7, BDCA2 or DCIR [66,67]. For example, ILT7 binds BST-2, an IFN-induced gene, initially described as an HIV restriction

factor that impedes viral release from infected cells [68]. Since HIV Vpu protein counteracts viral tethering by BST2, virus-free surface BST-2 can readily interact with ILT7, and thereby inhibits pDC IFN-I production [69]. While BST-2 is also expressed upon HTLV-1 infection, as opposed to the negative regulation of HIV release, it participates in efficient HTLV-1 cell-cell transmission [70]. Other negative regulatory receptors e.g., BDCA2 and DCIR bind complex-type sugars chains (terminal  $\beta$ -galactoside containing complex sugars [71,72], and mannose/fucose containing complex sugars [73,74], respectively). Since pDC IFN-I response to HTLV is modulated by the available terminal sugar composition at the surface of infected cells, one might speculate that the density of specific glycans, via the interaction with negative regulators, e.g., BDCA2 might regulate the levels of pDC IFN-I production induced by HTLV-infected cells as previously shown in other contexts [75–77]. Altogether our results provided an original illustration of the regulation of pDC IFN-I response by the surface glycan pattern of infected cells.

## Materials and Methods

**Cells.** Jurkat cells (from ATCC, ref ACC 282) stably transfected with a plasmid encoding the luciferase (Luc) gene under the control of the HTLV-1 long terminal repeat (LTR) promoter and the HTLV-1 Tax-transactivator (Jurkat-LTR-Luc) [34] were maintained under hygromycin selection (450 µg/mL, Sigma) in culture RPMI medium : RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Gibco Life Technologies), L-Glutamine (2 mM, Gibco Life technologies) and penicillin-streptomycin (100 U/mL and 100 µg/mL respectively; Gibco Life Technologies). HTLV-1 infected T-cell lines (C91-PL from Cellosaurus, ref CVCL\_0197, MT-2 from [78], Hut102 from [79] and C8166 from [39] which does not produce infectious virus) were maintained in culture RPMI medium. HTLV-2 infected cell lines (C19; MO) were obtained from [80] and maintained in culture RPMI medium supplemented with 20% FCS. The human fibrosarcoma cell line containing a plasmid encoding the luciferase gene under the control of the immediate early IFN-I inducible 6-16 promoter (HL116) (a kind gift from S. Pelligrini, Institut Pasteur, France) [81] was maintained under HAT selection in DMEM medium supplemented with 10% FCS and penicillin-streptomycin (100 U/mL and 100 µg/mL respectively). All cells were grown at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.

**Reagents.** Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Life Sciences); LPS, TLR7 agonist (R848) and TLR9 agonist (ODN2216) (Invivogen); TLR7 antagonist, IRS661 (5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3') synthesized on a phosphorothionate backbone (MWG Biotech); Fc Blocking solution (MACS Miltenyi Biotec); BDCA-4-magnetic beads for selective isolation of pDCs (MACS Miltenyi Biotec); IL-6 ELISA kit (Affymetrix, eBioscience); Lipofectamine 2000 (Life Technologies); 96-well format transwell chambers (Corning); LabTek II Chamber Slide System, 96-Well Optical-Bottom Plates and Nunc UpCell 96F Microwell Plate (Thermo Fisher Scientific); Vibrant cell-labeling solution (CM-DiI, Life

Technologies); Hoescht and Alexas-conjugated secondary antibodies (Life Technologies); High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems); Powerup Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems); pDC specific markers: mouse PE or APC-conjugated anti-CD123 (clone AC145, Miltenyi), mouse APC-conjugated anti-BDCA-2 (AC144; Miltenyi); Metalloproteinase 9 (Enzo Life Sciences); FITC-conjugated Peanut Agglutinin (PNA) (Sigma Aldrich); Alexa Fluor 680-conjugated Wheat Germ Agglutinin (WGA) (Thermo Fisher); FITC-conjugated WGA, Soy bean Agglutinin (SBA), Ulex europaeus agglutinin I (UEA-I) and Concanavalin A (ConA) were from Vectors; poly-L-lysine (Sigma, P4832), anti-HTLV-1 p19<sup>gag</sup> antibody (1:1000, Zeptometrix); recombinant VEGF<sub>165</sub> protein (R&D); Glut-1.RBD.GFP (Metafora biosystem); recombinant IFN- $\alpha$  2a (TEBU BIO PBL); anti-HTLV-1 Env gp46 antibody (1:1000, Zeptometrix), luciferase reporter activity assay (Promega); paraformaldehyde 20% (PFA; Electron Microscopy Sciences); saponin (Sigma); Heparin (Sigma).

### **Ethics Statement**

The pDCs and PBMCs were isolated from blood or cytopheresis units from healthy adult human volunteers which was obtained according to procedures approved by the “Etablissement Français du sang” (EFS) Committee. All donors provided informed consent to EFS.

**Isolation of pDCs and ex vivo co-culture experiments.** PBMCs were isolated using Ficoll-Hypaque density centrifugation. pDCs were positively selected from PBMCs using BDCA-4-magnetic beads (MACS Miltenyi Biotec) and pDCs were depleted from PBMCs, as previously described<sup>24</sup>. The typical yields of PBMCs and pDCs were  $800 \times 10^6$  and  $2 \times 10^6$  cells, respectively, with a typical purity of >91% pDCs, as we previously reported [24,25].



After isolation, pDCs ( $2 \times 10^4$ ) were plated in 96-well round bottom plates and cultured at  $37^\circ\text{C}$  with HTLV-1 or HTLV-2 infected cell lines ( $2 \times 10^4$  or other count when indicated), Jurkat cells ( $2 \times 10^4$ ), as negative control, or isolated HTLV-1 biofilm-like structures ( $100 \mu\text{L}$ ), or HTLV-1 biofilm-like structures depleted cells ( $2 \times 10^4$ ). When indicated, HTLV-2 infected cells (C19,  $10^6$  cells in RPMI culture medium) or HTLV-1 infected cells (C91,  $10^6$  in PBS) were treated with PNA ( $10 \mu\text{g/ml}$ , SIGMA) for 30 min at  $4^\circ\text{C}$  or neuraminidase ( $0,1 \text{U/ml}$ , SIGMA) for 1h at  $37^\circ\text{C}$  respectively. Treated cells were then washed twice in RPMI culture medium prior to co-culture ( $2 \times 10^4$ ) with pDC ( $2 \times 10^4$ ). Culture with isolated pDCs or PBMCs were maintained in RPMI 1640 medium (Life Technologies) supplemented with 10% FCS, 10 mM HEPES, 100 units/mL penicillin,  $100 \mu\text{g/mL}$  streptomycin, 2 mM L-glutamine, non-essential amino acids and 1 mM sodium pyruvate at  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ . The supernatants were collected at 20-24h after co-culture. When indicated, infected cells or uninfected cells were co-cultured with pDCs in 96-well format transwell chambers separated by a 0.4 mm membrane (Corning), as previously [24,25].

**IFN- $\alpha/\beta$  and IL-6 detection.** HL116 cells were seeded at  $2 \cdot 10^4$  cells/well in 96-well plate 24 h prior the assay, and incubated for 17 h with supernatant collected from pDC co-cultures ( $100 \mu\text{L}$ ) or serial dilution of recombinant human IFN- $\alpha$  2a (PBL Interferon Source), used for standard curve titration. Cells were then lysed and luciferase activity assayed. IFN-I levels were expressed as equivalent of IFN- $\alpha$  2a concentration, in Unit/mL. The detection of IL-6 by ELISA was performed as previously [24] using kit (Affymetrix, eBioscience) and according to the manufacturer instructions.

**Isolation of viral biofilm-like structures and purification of cell-free viruses.** HTLV-1 viral biofilm-like structure was prepared with a method that is slightly different from the original one [34] and as previously described [35]. Briefly C91-PL cells were plated ( $3 \cdot 10^5$  cells/mL) and cultured for 4 days. HTLV-1-infected cells were washed twice in RPMI-1640 serum-free

medium and incubated at  $1 \cdot 10^6$  cells/ml for 1 h at 37 °C, with gentle agitation every 10 minutes. Then, FCS (10% final) and penicillin-streptomycin (100 µg/mL final) were added, and cells centrifuged. Supernatant containing biofilm-like structures preparation was collected and supplemented with Hepes (10 mM), non-essential amino acid (2.5 mM), sodium pyruvate (1 mM), β-mercaptoethanol (0.05 mM) before immediate use.

Cell-free viruses were also obtained from C91-PL cells ( $10^6$  cells/mL) cultured for 24h at 37°C 5 % CO<sub>2</sub>. Supernatant were clarified by centrifugation (5 minutes at 800g) and filtrated through a 0.45 µm-diameter pore filter (Millipore, MA) to eliminate cell debris. Virions were purified by ultracentrifugation through a 20% (wt/vol) sucrose cushion at 100,000g in SW32 (Beckman) for 1h30 at 4°C and stored at -80°C before use. Virus concentration was determined using Retrotek HTLV-1/2 p19<sup>gag</sup> Antigen ELISA kit (Zeptomatrix) following manufacturer's instructions and as previously described [19].

**HTLV-1 viral Biofilm-like structures shedding.** C91-PL cells ( $10^6$  cells /mL) were treated with Metalloproteinase 9 (20 nM) in RPMI serum-free medium for 1h at 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Cells were washed twice with culture RPMI medium, and immediately used. The efficacy of HTLV-1 viral biofilm-like structures shredding was controlled by analyzing gp46 viral envelope level by FACS and viral transmission to T-cells using Jurkat LTR-Luc reporter cells.

**Viral Transmission to T-cells.** HTLV-1 (C91-PL, Hut102, MT-2), HTLV-2 (C19, MO) or uninfected (Jurkat) cell lines ( $10^3$ ,  $10^4$  or  $10^5$ ) were co-cultured with Jurkat LTR-Luc cells ( $10^4$ ). Different ratio of infected cells/target cells (1/10; 1/1 or 10/1) were incubated for 24 hours in round-bottom 96-wells plates at 37°C. Cells were washed once with PBS and stored at -80°C as dry pellets until assayed for luciferase reporter activity using manufacturer's instructions

(Promega). Luciferase results were normalized according to the amount of proteins determined by Bradford (Biorad).

**HTLV receptor competition assay.** Jurkat LTR-Luc cells ( $2 \times 10^5$ ) were incubated in culture RPMI medium with VEGF<sub>165</sub> (80-100 ng/mL) or 10 $\mu$ L Glut-1.RBD.GFP at 4°C during 30 minutes before co-culture with C91-PL cells ( $2 \times 10^4$ ) or with cell-free viruses (50 ng/mL of p19<sup>gag</sup> equivalent as measured by ELISA) for 2 hours at 37°C. Cells were then harvested, washed with PBS, fixed in 4 % PFA, permeabilized in PBS / 1% BSA / 0.05% Saponin and stained with an anti-p19<sup>gag</sup> antibody (1:1000) followed by FITC or Alexa Fluor 549-conjugated anti-mouse antibody. Fluorescence was acquired on at least 10 000 events with a FACSCanto II cytometer (BD Biosciences) and data analyzed on FlowJo software (Tree Star, Inc. Ashland, OR).

**Surface staining of Env gp46, BDCA-2/CD123, lectins analyzed by FACS.** HTLV-1 (C91-PL, Hut102, MT-2), HTLV-2 (C19, MO) or uninfected (Jurkat) cell lines ( $2.10^5$ ) were fixed with 4% PFA and stained with FITC-conjugated lectins (10  $\mu$ g/ml) for 30 minutes at 4°C. The level of gp46 surface expression was determined on unfixed C91-PL cells using anti-HTLV-1 Env gp46 antibody (1:1000 in PBS-1% BSA) for 1h at 4°C followed by Alexa488-coupled anti-mouse antibody for 30 min at 4°C. pDC were surface-stained with mouse PE or APC-conjugated anti-CD123 and mouse APC-conjugated anti-BDCA-2. Cells were then washed with PBS and fluorescence acquired using 20 000 events on a FACSCanto II cytometer, and analyzed with FlowJo software.

**Measurement of intracellular and secreted HTLV-1/2 particles by quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) analysis.** RNAs were isolated from samples harvested in guanidinium thiocyanate citrate buffer (GTC; Sigma-Aldrich) by phenol/chloroform extraction procedure as

previously described [25]. Reverse transcription was performed using the random hexamer-primed High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) and quantitative PCR was carried out using the Powerup SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). The absolute numbers of HTLV-1 transcripts were normalized to the total amount of RNA. For supernatant samples, qRT-PCR was controlled by the addition of exogenous carrier RNAs encoding *xef1 $\alpha$*  (xenopus transcription factor 1 $\alpha$ ) in supernatant diluted in GTC buffer, as previously described [24,25].

For quantification of viral genomic RNA the following primers were used: HTLV-1 Forward (AAAGCGTGGAGACAGTTCAGG), HTLV-1 Reverse (CAAAGGCCCGGTCTCGAC), HTLV-2 Forward (CCTTGGGGATCCATCCTCTC), HTLV-2 Reverse (TCTCTAAAGACCCTCGGGGAG). For quantification of viral RNA present in the supernatant of infected cells, the following primers were used: Tax 1 Forward (GGATACC CAGTCTACGTGTTTGG), Tax 2 Forward (GGATACCCCGTCTACGTGTTTGG), Tax 1/2 Reverse (GGGGTAAGGACCTTGAGGGT).

**Imaging combined with flow cytometry analysis of pDC/infected cell conjugates using Image Stream X technology.** HTLV-1 (C91-PL, Hut102, MT-2), HTLV-2 (C19, MO) cell lines and control uninfected Jurkat cells ( $5 \times 10^5$ ) were transduced in 24 well plate with lentiviral-based vector pseudotyped with VSV glycoprotein to stably express GFP. Briefly,  $10^5$  GFP-expressing HTLV infected cells and control cells were co-cultured with  $4 \times 10^4$  pDCs in low-adherence micro-plate designed for cell harvesting by temperature reduction (Nunc UpCell 96F Microwell Plate from Thermo Scientific) for 4-5 hours at 37°C, and, as indicated, in presence or not of heparin. The co-cultured cells were detached by 20 minute-incubation at room temperature, harvested and fixed in 4% PFA. Cells were then washed twice with staining buffer (PBS 2% FBS), and pDCs were stained by the pDC-specific CD123 marker. Co-cultured cells were analyzed by Image Stream X technology (Amnis) at magnification x40 using IDEAS software, as previously described [24,25]. The cell population defined as pDC/HTLV-infected

or uninfected cell conjugates comprises conjugates of at least one CD123 APC positive cell and at least one GFP positive cell among the total of CD123 APC-positive cells, GFP-positive cells and conjugates. As shown by representative images (**S2 Fig**), the population gated as pDC-HTLV-1-infected cell conjugates corresponded to GFP positive/CD123 positive cell conjugates, as expected, with a 80-95 % purity. The cell populations were sorted using masks (IDEAS software) to eliminate cells out of focus and/or with saturating fluorescent signal, and then selected based on cell size of the positive cells (*i.e.*, fluorescent signal area).

**Immunofluorescence staining.** For lectin/HTLV-1/2 virus localization analysis, HTLV-1 (C91-PL, Hut102, MT-2), HTLV-2 (C19, MO) or uninfected (Jurkat) cell lines cultured on Labtek chamber slides (Nunc) previously treated with 0.01 % poly-L-lysine (Sigma, P4832) were surface-stained with FITC-conjugated PNA or WGA (10 $\mu$ g/ml), fixed in 4% PFA, then permeabilized and stained with HTLV-1/2 matrix protein p19<sup>gag</sup> antibodies (1/1000) followed by Alexa Fluor549-conjugated anti mouse antibodies. Cells were counterstained with DAPI-Fluoromount G before analysis on Zeiss LSM 800 microscope. Images were acquired on ImageJ.

For pDC/HTLV-infected cells conjugates analysis, 4x10<sup>4</sup> pDCs were stained using either 0.5  $\mu$ M Vibrant cell-labeling solution as previously[24]. Labeled pDCs were washed twice with PBS and then co-cultured with 2x10<sup>4</sup> HTLV infected cells for 4-5 hours at 37°C, in a 96-Well Optical-Bottom Plate pre-coated with 8  $\mu$ g/mL poly-L-lysine for 30 minutes at 37°C. Cells were then fixed in 4% PFA, washed with PBS and PBS-3%BSA, and stained with anti-HTLV-1 Env gp46 antibody (1:1000 in PBS-3%BSA) for one hour at room temperature. Prior antibody staining, cells were stained by WGA lectin coupled to Alexa 680 (Molecular Probes, ref W32465) diluted at 10 $\mu$ g/mL in HBSS, for 10 minutes at room temperature, then washed three times with HBSS. After three washes with PBS, cells were incubated with Alexa488-

conjugated-anti-mouse antibody in 3% BSA-PBS and added to the cells along with Hoechst diluted at 1:500 (Molecular Probes) for 1 hour at room temperature. After three washes with PBS, cells were observed with a Zeiss LSM 710 laser scanning confocal microscope. The quantification of the phenotypes defined to as clusters at the contact were performed using Image J software package.

**Statistical analysis.** Statistical analysis was performed using PRISM v7.03 software (Graphpad). One-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's post-hoc multiple comparison test was used to determine statistically significant differences. Paired two-tail t-test was used to compare two groups from the same donor. Differences were considered significant if the p-value was  $< 0.05$ .

## **Acknowledgement**

We thank the microscopy and cytometry facility team of the Lyon SFR Biosciences. We thank Julie Massola for excellent technical assistance, Margaux Hubert and Thomas Chevallay for their help at the beginning of the project. We acknowledge Dr. Chloé Journo and Yvon Jaillais for critical reading and helpful discussions, Dr. Olivier Schwartz (Pasteur Institute) and Dr Jenny Valladeau (CRCL) for helpful discussions. We thank Dr S. Pelligrini (Pasteur Institute), and Dr M.I. Thoulouze (Pasteur Institute) for the gift of the HL116 cells and Jurkat-LTR-Luc cells, respectively.

## Figure legends

**Figure 1. HTLV-1 infected cells robustly trigger IFN-I response by pDCs in a TLR7- and cell-cell contact dependent manner.** **A.** Representative FACS analysis of pDC isolation and depletion from PBMCs using the CD123 and BDCA-2 pDC selective markers. **B.** Representative quantification of IFN-I activity in the supernatants of PBMCs, isolated pDCs and pDC-depleted PBMCs (responders) co-cultured with HTLV-1 infected cells (HTLV-1) or uninfected cells (cont cells), or their supernatants (SN) as indicated (inducers). The results are expressed as unit (U)/mL (one unit corresponding to 10-20 pg of recombinant IFN- $\alpha$  2a). Results are representative of 3 independent experiments (means of experimental triplicates  $\pm$  standard deviation; SD). Arrows indicate results below threshold detection of the assay (i.e. 2.5 U/mL). **C.** Quantification of IL6 in the supernatants (SN) of PBMCs, pDC-depleted PBMCs treated or not with LPS, as indicated (inducers). Arrows indicate results below threshold detection of the assay (i.e., 4 pg/mL). **D.** Quantification of IFN-I activity (as in B) secreted by pDCs ( $2 \times 10^4$ ) isolated from the blood of a cohort of healthy donors ( $n = 27$ ) co-cultured with HTLV-1 infected cells ( $2 \times 10^4$ ) or uninfected (cont) cells ( $2 \times 10^4$ ). Graph shows minimum, maximum and median values as well as q1-q3 quartiles. **E.** Quantification of IFN-I activity in the SNs of pDCs that were pre-incubated, or not, with TLR7 inhibitor (IRS661, 0.35  $\mu$ M), as indicated, then co-cultured with infected cells (HTLV-1 cells) or with control cells and stimulated by agonist of TLR7 (R848, 50 ng/mL) or of TLR9 (ODN2216, 0.1  $\mu$ M). Results are expressed relative to IFN-I activity determined in the absence of TLR7 inhibitor, set at 100 (means  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). **F.** Quantification of IFN-I activity in SNs of pDCs co-cultured with HTLV-1 infected cells either seeded together (CO) or separated by a 0.4  $\mu$ m transwell membrane (TW). As controls, pDCs were treated with TLR7 agonist (as in E) in the same set-up. Results are representative of 4 independent experiments in triplicate (means  $\pm$  SD). **G.**



Paralleled quantification of IFN-I activity produced by pDCs upon co-culture with HTLV-1-infected cells versus C8166 HTLV-1-infected (labeled as defective cells; left axis) and the infectivity transmission levels to naïve Jurkat-LTR-Luc cells upon co-culture with the same HTLV-1-infected cells or C8166 HTLV-1-infected defective cells (right axis). RLU, relative light unit (mean  $\pm$  SD, 2 independent experiments). Asterisks indicate statistically significant differences calculated using unpaired t-test: \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; ns: non significant.

**Figure 2. The HTLV-1 receptor Glut-1 is involved in pDC IFN-I production triggered by the sensing of HTLV-1 infected cells, but not Neuropilin-1/BDCA-4.** **A.** Assessment by FACS of the surface expression of the HTLV-1 receptors Glut-1 (revealed with Glut-1.RBD.GFP) and NRP-1/BDCA-4 (revealed with mAb) (representative of 3 independent experiments). **B-C.** Impact of Glut-1 binding competitor (RBD,  $5\mu\text{l}/10^5$  cells) or NRP-1/BDCA-4 binding competitor (VEGF<sub>165</sub>, 100 ng/mL) on IFN-I activity in SNs of pDCs co-cultured with HTLV-1-infected cells (mean  $\pm$  SD, 5 independent experiments) (B) and infectivity transmission levels (mean  $\pm$  SD, 3 independent experiments) (C), determined as in Fig 1. The results are expressed as percentages relative to untreated co-cultures. **D.** Viral binding as determined by flow cytometry after p19<sup>gag</sup> detection on Jurkat target cells upon exposure to HTLV-1 cell-free viruses or upon co-culture with HTLV-1 infected cells in the presence or not of NRP-1/BDCA-4 binding competitor, VEGF<sub>165</sub>, 80 ng/mL. Jurkat cells were differentiated from HTLV-1 infected cells based on their size (see **S1 Fig**). The results are expressed as percentage relative to untreated conditions (mean  $\pm$  SD of 2-3 independent experiments). Asterisks indicate statistically significant differences calculated using ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test: \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns= non significant.

**Figure 3. HTLV biofilm-like structures trigger a robust activation of pDC-IFN-I response.**

**A.** Representative confocal imaging of pDC/HTLV-1 infected cell contact with 3 consecutive Z-stack sections (left to right). Upper panels, confocal analysis of HTLV-1 Env gp46 (immunodetection without detergent, green) that form cluster at the contact between HTLV-1 infected cells and pDCs (stained with DiI, a lipophilic dye, red). Carbohydrate-rich structures are stained by the WGA lectin (*Triticum vulgare*, purple), and nucleus (blue). Middle and lower panels, single detections of WGA lectin and HTLV-1 Env gp46, respectively. **B.** Quantification of the presence or not of Env gp46 and WGA co-clusters at the cell-cell contact (analysis of 16 cell-cell contacts in 3 independent experiments). **C-D.** Parallel quantification of IFN-I activity in SNs of pDCs co-cultured with HTLV-1-infected cells versus biofilm-like structures isolated from HTLV-1-infected cells and infectivity transmission levels, determined as in Fig 1G and 2C (mean  $\pm$  SD, 3 independent experiments performed with similar viral capsid levels in the isolated HTLV-1 biofilm-like structure as determined by p19<sup>gag</sup> levels, i.e. 2.9 ng). Asterisks indicate statistically significant differences calculated using ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test: \*\*\*\* p<0.0001. **E.** Surface Env gp46 detection on HTLV-1 infected cells treated or not with metalloproteinase 9 (MMP-9; 20 nM). **F-G.** Parallel quantifications of IFN-I activity in SNs of pDCs co-cultured with HTLV-1-infected cells treated or not with MMP-9 as in C, and infectivity transmission levels determined as in Fig 2B. The results are representative of 2 independent experiments (mean  $\pm$  SD of triplicates results).

**Figure 4. Heparin, jointly increases pDC/infected cell contacts and pDC activation by both**

**HTLV-infected cells and isolated HTLV biofilm-like structures.** **A.** Quantification of the conjugates between CD123-stained pDCs and GFP-expressing HTLV-1 infected cells analyzed by imaging flow cytometry in co-cultures treated or not with heparin (50 U/ml). Results are expressed as percentages of pDC/HTLV-1 cell conjugates i.e., conjugates of at least one cell

solely CD123<sup>+</sup> and one cell GFP<sup>+</sup>, relative to the total number of single cells (GFP<sup>+</sup> or CD123<sup>+</sup>) and the conjugates (mean  $\pm$  SD, 3 independent experiments, n=8000 events per condition). Asterisks indicate statistically significant differences calculated using ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test: \*\* p<0.01. **B.** Quantification of heparin treatment (50 U/mL) on IFN-I production in SNs of pDCs co-cultured with HTLV-1-infected cells or HTLV-1-purified biofilm-like structures i.e., 2.9 ng as determined by p19<sup>gag</sup> ELISA (mean  $\pm$  SD of triplicates results, representative of 3 independent experiments). **C.** Quantification of infectivity transmission levels to naïve Jurkat-LTR-Luc cells in presence or not of heparin upon co-culture with the HTLV-1-infected cells or isolated HTLV-1 purified biofilm-like structures (mean  $\pm$  SD, 3 independent experiments with similar viral capsid levels in the isolated HTLV-1 biofilm-like structure as determined by p19<sup>gag</sup> levels). NS indicates statistically non-significant differences calculated using ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test.

**Figure 5. Levels of pDC IFN-I production triggered by HTLV infected cells inversely correlated to the efficiency of infectious viral transmission via cell-cell contact. A.** IFN-I levels were quantified after co-culture of increasing number ( $2 \times 10^3$ ;  $2 \times 10^4$ ;  $2 \times 10^5$ ) of HTLV-1 (C91-PL; Hut102; MT-2) or HTLV-2 infected cells (C19; MO) with pDCs ( $2 \times 10^4$ ). The infected cells:pDC ratio is indicated on the right of the graph. Arrows indicate the maximum level of IFN-I for each cell line setting. (mean of 3 independent experiments). **B.** Parallel representation of the maximum levels of IFN-I production induced after co-culture of pDCs with HTLV-infected cells and of **(B)** intracellular viral RNA present in the cytoplasm of HTLV-infected cell lines (mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments); **(C)** viral RNA released in the supernatant of HTLV-infected cell lines after 24h of culture (mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments); **(D)** the percentage of cell-cell contact established between pDCs and HTLV-infected cells (mean  $\pm$  SD of 2-4 independent experiments); or **(E)** maximum infectivity levels

as determined in **S4D Fig** (n=3). **F.** Correlation curve of pDC-dependent IFN-I production and viral transmission and calculated p value.

**Figure 6. The differential surface glycan composition of HTLV-infected cells regulates the levels of pDC IFN-I production**

**A.** Quantification of heparin treatment of HTLV-infected cells on the level of infectious viral transmission to naïve reported Jurkat-LTR-Luc cells, determined as in Fig 4C (mean  $\pm$  SD of 2-3 independent experiments). NS indicates statistically non-significant differences calculated using ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test. **B.** Quantification of the conjugates between CD123-stained pDCs and GFP-expressing HTLV-infected cells analyzed by imaging flow cytometry in the presence or not of heparin (50 U/mL). Results are expressed as percentages of pDC/HTLV-infected cell conjugates as in Fig 4A (mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments). Asterisks indicate statistically significant differences calculated using ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test: \*\* p<0.01; ns= non significant. **C.** Quantification of heparin treatment (as in Fig 4) on IFN-I production in SNs of pDCs co-cultured with HTLV-infected cells (mean $\pm$  SD, 8 and 3 independent experiments for HTLV-1 infected cells and HTLV-2-infected cells, respectively). Asterisks indicate statistically significant differences calculated using ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test: \*\* p<0.01; ns= non significant. **D.** Parallel representation of the maximum levels of IFN-I production induced after co-culture of pDCs with HTLV-1-infected cells and the amount of surface PNA binding on HTLV-2 (C19 and MO) infected cell lines and HTLV-1 (C91-PL; Hut102 and MT-2) infected cell lines (Mean  $\pm$  SD of 5 independent experiments). **E-F.** Regression correlation curve of the amount of PNA binding at the surface of HTLV-infected cells and the maximum IFN-Production induced by the HTLV-infected cells (E) or the level of infectious viral transmission to naïve reported Jurkat LTR-Luc cells (F). Computes correlation p-values calculated with Spearman test are indicated. **G.** Quantification

of IFN-I production by pDCs co-cultured with C19 or C91-PL infected cells in presence of PNA or neuraminidase, as indicated. Results are presented as fold changes relative to untreated cells (mean  $\pm$  SD, 5 independent experiments). Asterisks indicate statistically significant differences calculated using unpaired t-test between treated versus untreated setting: \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001. **H.** FACS analysis of C19 stained or not with PNA and C91-PL infected cells treated or not with neuraminidase (Neu, 0.1 U/ml) before staining with PNA (mean  $\pm$  SD of 4 and 3 independent experiments respectively). Asterisks indicate statistically significant differences calculated using paired t-test between treated versus untreated setting: \*\*\*\* p<0.0001; \*\*\* p<0.001.

## Supplementary information

### Supplementary Figure legend

**Supplementary Figure 1. FACS gating strategy used for the analysis of VEGF<sub>165</sub> competition.** Cell populations (C91-PL ; Jurkat cells or co-culture of C91-PL and Jurkat cells) were gated based on their size (FCS) and granulosity (SSC), and p19<sup>gag</sup> expression determined on each population. C91-PL population was used as a positive control for p19<sup>gag</sup> expression while Jurkat cell population was used as a negative control. The percentage of p19<sup>gag</sup> positive Jurkat cells in the co-culture with C91-PL is shown. (Representative of 3 independent experiments.).

**Supplementary Figure 2. Increase of pDC IFN-I production and cell-cell contact by heparin treatment. A.** Imaging flow cytometry analysis (ImageStream) of HTLV-1 infected cells, which stably express GFP, and co-cultured with pDCs for 4-5 hours, as in the Fig 4B. pDCs are detected by the immunostaining of CD123, a pDC specific marker. Representative pictures of the cell population gated as conjugates between pDCs and GFP expressing infected cells (upper panels), of the cell population gated as HTLV-1 infected cells (GFP positive cells, middle panels) and of the cell population gated as pDCs, single cells (CD123 positive cells, lower panels), are shown. Panels, as displayed from the left to the right, Bright field; GFP field; APC field; GFP/APC field and Merge. **B.** Quantifications of the effect of heparin treatment (as in Fig 4C) on IFN-I production in SNs of pDCs co-cultured with HTLV-1-infected cells or HTLV-1-purified biofilm-like structure normalized to the amount of p19 measured in each biofilm-like structures preparation. The results are expressed as fold-increase relative to the untreated controls (mean  $\pm$  SD, 10 and 3 independent experiments for HTLV-1 infected cells

and biofilm-like structure, respectively). Asterisks indicate statistically significant differences calculated using ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test: \*\*\*  $p < 0.001$ .

**Supplementary Figure 3. Lack of correlation between pDC-induced IFN-I production and HTLV RNA production or cell-conjugates formation. A-C.** IFN-I amounts (U/ml) induced by HTLV- infected cells plotted against the corresponding intracellular RNA levels (A), extracellular RNA levels (B) or the percentage of cell-conjugates (C). Compute correlation p values are indicated. **D.** Infectivity levels determined after co-culture of Jurkat-LTR-Luc reporter cells ( $10^4$  or  $10^5$ ) with HTLV-1 or HTLV-2 infected cells ( $10^4$  or  $10^5$ ). The infected cells/reporter cell ratio (1:10 represents  $10^4$  infected cells for  $10^5$  reporter cells, 1:1 represents  $10^5$  infected cells for  $10^5$  reporter cells, 10:1 represents  $10^5$  infected cells for  $10^4$  reporter cells) is indicated on the right of the graph. RLU, relative light unit. Arrows indicate the maximum level of RLU relative to viral transmission for each cell line setting. (mean of 3 independent experiments).

**Supplementary Figure 4. Viral accumulation at the surface of HTLV-infected cells and IFN-I induction by HTLV-2 infected cells, as that induced by HTLV-1 infected cells, requires receptors for viral fusion but not for viral binding. A-C.** Impact of Glut-1 binding competitor (RBD,  $5\mu\text{L}/10^5$  cells, A) or NRP-1/BDCA-4 binding competitor (VEGF<sub>165</sub>, 100 ng/mL, C) on IFN-I activity in SNs of pDCs co-cultured with HTLV-1-infected cells (C91-PL) or HTLV-2 infected cells (C19). **B-D** Corresponding infectivity levels, determined as in Fig 2C. The results are expressed as percentages relative to untreated co-cultures (mean  $\pm$  SD, 3-5 independent experiments). Asterisks indicate statistically significant differences calculated using ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test: \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; ns= non significant. **E.** Representative images (of 3 independent experiments) obtained by confocal

microscopy of HTLV-1 (C91-PL ; MT-2 or Hut102) or HTLV-2 (C19 or MO) -infected cells immunostained against p19<sup>gag</sup> (red) and DAPI for nuclei (blue). Scale bar = 5 $\mu$ m.

**Supplementary Figure 5. Surface binding of lectins on HTLV-1/2 infected cells.** **A.** Name and binding specificity of the different lectins. **B.** Surface binding quantification of the various lectin on the HTLV-1/2 infected cells determined by FACS using FITC-coupled lectin. (Mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments). Asterisks indicate statistically significant differences calculated using ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test: \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\*\* p<0.0001; ns= non significant **C.** Representative images obtained by confocal microscopy of HTLV-1- (C91-PL ; MT-2 or Hut102) or HTLV-2- (C19 or MO) infected cells immunostained with FITC-coupled PNA (green) and DAPI for nuclei (blue). Scale bar = 5 $\mu$ m. **D.** Correlation curve of SBA expression (MFI) and pDC IFN-I production induced by coculture with HTLV-1 and HTLV-2 infected cells. Compute correlation p value is indicated.



## References

1. Bruhn RL, Mahieux R, Murphy EL. Human lymphotropic viruses: HTLV-1 and HTLV-2. *Clinical Virology* 4th edition, ASM press.; 2017.
2. Willems L, Hasegawa H, Accolla R, Bangham C, Bazarbachi A, Bertazzoni U, et al. Reducing the global burden of HTLV-1 infection: An agenda for research and action. *Antivir Res.* 2017;137: 41–48. doi:10.1016/j.antiviral.2016.10.015
3. Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood.* 1977;50: 481–92.
4. Gessain A, Barin F, Vernant J, Gout O, Maurs L, Calender A, et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet.* 1985;2: 407–410.
5. Jones KS, Petrow-Sadowski C, Huang YK, Bertolette DC, Ruscetti FW. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nat Med.* 2008;14: 429–36. doi:10.1038/nm1745
6. Hishizawa M, Imada K, Kitawaki T, Ueda M, Kadowaki N, Uchiyama T. Depletion and impaired interferon-alpha-producing capacity of blood plasmacytoid dendritic cells in human T-cell leukaemia virus type I-infected individuals. *Br J Haematol.* 2004;125: 568–75. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.04956.x
7. Macatonia S, Cruickshank J, Rudge P, Knight S. Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1992;8: 1699–1706.
8. Makino M, Wakamatsu S, Shimokubo S, Arima N, Baba M. Production of functionally deficient dendritic cells from HTLV-I-infected monocytes: implications for the dendritic cell defect in adult T cell leukemia. *Virology.* 2000;274: 140–8. doi:10.1006/viro.2000.0445
9. Kannagi M, Hasegawa A, Takamori A, Kinpara S, Utsunomiya A. The roles of acquired and innate immunity in human T-cell leukemia virus type 1-mediated diseases. *Front Microbiol.* 2012;3: 323. doi:10.3389/fmicb.2012.00323
10. Broz P, Monack DM. Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2013;13: 551–65. doi:10.1038/nri3479
11. Garcia-Sastre A. Ten Strategies of Interferon Evasion by Viruses. *Cell Host Microbe.* 2017;22: 176–184. doi:10.1016/j.chom.2017.07.012
12. Wang J, Yang S, Liu L, Wang H, Yang B. HTLV-1 Tax impairs K63-linked ubiquitination of STING to evade host innate immunity. *Virus Res.* 2017;232: 13–21. doi:10.1016/j.virusres.2017.01.016
13. Yuen CK, Chan CP, Fung SY, Wang PH, Wong WM, Tang HM, et al. Suppression of Type I Interferon Production by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Oncoprotein Tax through Inhibition of IRF3 Phosphorylation. *J Virol.* 2016;90: 3902–12. doi:10.1128/JVI.00129-16
14. Hyun J, Ramos JC, Toomey N, Balachandran S, Lavorgna A, Harhaj E, et al. Oncogenic human T-cell lymphotropic virus type 1 tax suppression of primary innate immune signaling pathways. *J Virol.* 2015;89: 4880–93. doi:10.1128/JVI.02493-14
15. Olierie S, Hernandez E, Lezin A, Arguello M, Douville R, Nguyen TL, et al. HTLV-1 evades type I interferon antiviral signaling by inducing the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1). *PLoS Pathog.* 2010;6: e1001177. doi:10.1371/journal.ppat.1001177
16. Journo C, Mahieux R. HTLV-1 and innate immunity. *Viruses.* 2011;3: 1374–94. doi:10.3390/v3081374
17. Hinuma Y, Komoda H, Chosa T, Kondo T, Kohakura M, Takenaka T, et al. Antibodies to adult T-cell leukemia-virus-associated antigen (ATLA) in sera from patients with ATL and controls in Japan: a nation-wide sero-epidemiologic study. *Int J Cancer.* 1982;29: 631–5.

18. Kinpara S, Kijiyama M, Takamori A, Hasegawa A, Sasada A, Masuda T, et al. Interferon-alpha (IFN-alpha) suppresses HTLV-1 gene expression and cell cycling, while IFN-alpha combined with zidovudine induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-1-infected cells. *Retrovirology*. 2013;10: 52. doi:10.1186/1742-4690-10-52
19. Cachat A, Chevalier SA, Alais S, Ko NL, Ratner L, Journo C, et al. Alpha interferon restricts human T-lymphotropic virus type 1 and 2 de novo infection through PKR activation. *J Virol*. 2013;87: 13386–96. doi:10.1128/JVI.02758-13
20. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2015;15: 471–85. doi:10.1038/nri3865
21. Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*. 2008;8: 594–606. doi:10.1038/nri2358
22. Colisson R, Barblu L, Gras C, Raynaud F, Hadj-Slimane R, Pique C, et al. Free HTLV-1 induces TLR7-dependent innate immune response and TRAIL relocalization in killer plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2010;115: 2177–85. doi:10.1182/blood-2009-06-224741
23. Webster B, Assil S, Dreux M. Cell-Cell Sensing of Viral Infection by Plasmacytoid Dendritic Cells. *J Virol*. 2016;90: 10050–10053. doi:10.1128/JVI.01692-16
24. Decembre E, Assil S, Hillaire ML, Dejnirattisai W, Mongkolsapaya J, Screaton GR, et al. Sensing of immature particles produced by dengue virus infected cells induces an antiviral response by plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Pathog*. 2014;10: e1004434. doi:10.1371/journal.ppat.1004434
25. Dreux M, Garaigorta U, Boyd B, Decembre E, Chung J, Whitten-Bauer C, et al. Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell Host Microbe*. 2012;12: 558–70. doi:10.1016/j.chom.2012.08.010
26. Lepelley A, Louis S, Sourisseau M, Law HK, Pothlichet J, Schilte C, et al. Innate sensing of HIV-infected cells. *PLoS Pathog*. 2011;7: e1001284. doi:10.1371/journal.ppat.1001284
27. Wieland SF, Takahashi K, Boyd B, Whitten-Bauer C, Ngo N, de la Torre JC, et al. Human pDCs Sense LCMV Infected Cells in vitro. *J Virol*. 2013; doi:10.1128/JVI.01714-13
28. Bruni D, Chazal M, Sinigaglia L, Chauveau L, Schwartz O, Despres P, et al. Viral entry route determines how human plasmacytoid dendritic cells produce type I interferons. *Sci Signal*. 2015;8: ra25. doi:10.1126/scisignal.aaa1552
29. Feng Z, Li Y, McKnight KL, Hensley L, Lanford RE, Walker CM, et al. Human pDCs preferentially sense enveloped hepatitis A virions. *J Clin Invest*. 2015;125: 169–76. doi:10.1172/JCI77527
30. Webster B, Werneke SW, Zafirova B, This S, Coléon S, Decembre E, et al. Plasmacytoid Dendritic Cells Control Dengue and Chikungunya Virus Infections via IRF7-regulated interferon responses. 2018;in press.
31. Takahashi K, Asabe S, Wieland S, Garaigorta U, Gastaminza P, Isogawa M, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc Natl Acad Sci U A*. 2010;107: 7431–6. doi:10.1073/pnas.1002301107
32. Rizkallah G, Alais S, Futsch N, Tanaka Y, Journo C, Mahieux R, et al. Dendritic cell maturation, but not type I interferon exposure, restricts infection by HTLV-1, and viral transmission to T-cells. *PLoS Pathog*. 2017;13: e1006353. doi:10.1371/journal.ppat.1006353
33. Nejmeddine M, Barnard AL, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham CR. Human T-lymphotropic virus, type 1, tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. *J Biol Chem*. 2005;280: 29653–29660. doi:10.1074/jbc.M502639200
34. Pais-Correia AM, Sachse M, Guadagnini S, Robbiati V, Lasserre R, Gessain A, et al. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat Med*. 2010;16: 83–9. doi:10.1038/nm.2065

35. Alais S, Mahieux R, Dutartre H. Viral Source-Independent High Susceptibility of Dendritic Cells to Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection Compared to That of T Lymphocytes. *J Virol.* 2015;89: 10580–90. doi:10.1128/JVI.01799-15
36. Popovic M, Lange-Wantzin G, Sarin PS, Mann D, Gallo RC. Transformation of human umbilical cord blood T cells by human T-cell leukemia/lymphoma virus. *Proc Natl Acad Sci U A.* 1983;80: 5402–6.
37. Baglio SR, van Eijndhoven MA, Koppers-Lalic D, Berenguer J, Lougheed SM, Gibbs S, et al. Sensing of latent EBV infection through exosomal transfer of 5'pppRNA. *Proc Natl Acad Sci U A.* 2016;113: E587-96. doi:10.1073/pnas.1518130113
38. Jaworski E, Narayanan A, Van Duyne R, Shabbeer-Meyering S, Iordanskiy S, Saifuddin M, et al. Human T-lymphotropic virus type 1-infected cells secrete exosomes that contain Tax protein. *J Biol Chem.* 2014;289: 22284–305. doi:10.1074/jbc.M114.549659
39. Bhat NK, Adachi Y, Samuel KP, Derse D. HTLV-1 gene expression by defective proviruses in an infected T-cell line. *Virology.* 1993;196: 15–24. doi:10.1006/viro.1993.1450
40. Lambert S, Bouttier M, Vassy R, Seigneuret M, Petrow-Sadowski C, Janvier S, et al. HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. *Blood.* 2009;113: 5176–85. doi:10.1182/blood-2008-04-150342
41. Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M, Battini JL. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell.* 2003;115: 449–59.
42. Manel N, Battini JL, Sitbon M. Human T cell leukemia virus envelope binding and virus entry are mediated by distinct domains of the glucose transporter GLUT1. *J Biol Chem.* 2005;280: 29025–9. doi:10.1074/jbc.M504549200
43. Kim FJ, Manel N, Garrido EN, Valle C, Sitbon M, Battini JL. HTLV-1 and -2 envelope SU subdomains and critical determinants in receptor binding. *Retrovirology.* 2004;1: 41. doi:10.1186/1742-4690-1-41
44. Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;10: 602–8.
45. Afratis NA, Nikitovic D, Mulhaupt HA, Theocharis AD, Couchman JR, Karamanos NK. Syndecans - key regulators of cell signaling and biological functions. *FEBS J.* 2017;284: 27–41. doi:10.1111/febs.13940
46. Jones KS, Lambert S, Bouttier M, Benit L, Ruscetti FW, Hermine O, et al. Molecular aspects of HTLV-1 entry: functional domains of the HTLV-1 surface subunit (SU) and their relationships to the entry receptors. *Viruses.* 2011;3: 794–810. doi:10.3390/v3060794
47. Chevalier SA, Turpin J, Cachat A, Afonso PV, Gessain A, Brady JN, et al. Gem-induced cytoskeleton remodeling increases cellular migration of HTLV-1-infected cells, formation of infected-to-target T-cell conjugates and viral transmission. *PLoS Pathog.* 2014;10: e1003917. doi:10.1371/journal.ppat.1003917
48. Akl MR, Nagpal P, Ayoub NM, Prabhu SA, Gliksman M, Tai B, et al. Molecular and clinical profiles of syndecan-1 in solid and hematological cancer for prognosis and precision medicine. *Oncotarget.* 2015;6: 28693–715. doi:10.18632/oncotarget.4981
49. Varki A, Kornfeld S. Historical Background and Overview. 2015; doi:10.1101/glycobiology.3e.001
50. Kinpara S, Hasegawa A, Utsunomiya A, Nishitsuji H, Furukawa H, Masuda T, et al. Stromal cell-mediated suppression of human T-cell leukemia virus type 1 expression in vitro and in vivo by type I interferon. *J Virol.* 2009;83: 5101–8. doi:10.1128/JVI.02564-08
51. Hanon E, Asquith RE, Taylor GP, Tanaka Y, Weber JN, Bangham CR. High frequency of viral protein expression in human T cell lymphotropic virus type 1-infected peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2000;16: 1711–5. doi:10.1089/08892220050193191
52. Kanai Y, Nittono H, Kubo K, Sasaki-Aoki S, Iwanaga M. Early somatosensory event-

- related potentials reveal attentional bias for internal stimuli in social anxiety. *Biol Psychol.* 2012;89: 591–7. doi:10.1016/j.biopsycho.2012.01.005
53. Demontis MA, Sadiq MT, Golz S, Taylor GP. HTLV-1 viral RNA is detected rarely in plasma of HTLV-1 infected subjects. *J Med Virol.* 2015; doi:10.1002/jmv.24264
54. Miyazato P, Matsuo M, Katsuya H, Satou Y. Transcriptional and Epigenetic Regulatory Mechanisms Affecting HTLV-1 Provirus. *Viruses.* 2016;8: 171. doi:10.3390/v8060171
55. Kulkarni A, Mateus M, Thinnes CC, McCullagh JS, Schofield CJ, Taylor GP, et al. Glucose Metabolism and Oxygen Availability Govern Reactivation of the Latent Human Retrovirus HTLV-1. *Cell Chem Biol.* 2017;24: 1377-1387.e3. doi:10.1016/j.chembiol.2017.08.016
56. Tattermusch S, Skinner JA, Chaussabel D, Banchereau J, Berry MP, McNab FW, et al. Systems biology approaches reveal a specific interferon-inducible signature in HTLV-1 associated myelopathy. *PLoS Pathog.* 2012;8: e1002480. doi:10.1371/journal.ppat.1002480
57. Zhong P, Agosto LM, Ilinskaya A, Dorjbal B, Truong R, Derse D, et al. Cell-to-cell transmission can overcome multiple donor and target cell barriers imposed on cell-free HIV. *PLoS One.* 2013;8: e53138. doi:10.1371/journal.pone.0053138
58. Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP, Weber JN, Griffiths GM, et al. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science.* 2003;299: 1713–6. doi:10.1126/science.1080115
59. Jain P, Manuel SL, Khan ZK, Ahuja J, Quann K, Wigdahl B. DC-SIGN mediates cell-free infection and transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 by dendritic cells. *J Virol.* 2009;83: 10908–21. doi:10.1128/JVI.01054-09
60. Jones KS, Fugo K, Cari P-S, Huang Y, Bertolette DC, Lisinski I, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells. *J Virol.* 2006;80: 8291–8302. doi:10.1128/JVI.00389-06
61. Norden R, Nystrom K, Aurelius J, Brisslert M, Olofsson S. Virus-induced appearance of the selectin ligand sLeX in herpes simplex virus type 1-infected T-cells: involvement of host and viral factors. *Glycobiology.* 2013;23: 310–21. doi:10.1093/glycob/cws160
62. Chung TW, Kim SJ, Choi HJ, Song KH, Jin UH, Yu DY, et al. Hepatitis B virus X protein specially regulates the sialyl lewis a synthesis among glycosylation events for metastasis. *Mol Cancer.* 2014;13: 222. doi:10.1186/1476-4598-13-222
63. Nakamura S, Horie M, Daidoji T, Honda T, Yasugi M, Kuno A, et al. Influenza A Virus-Induced Expression of a GalNAc Transferase, GALNT3, via MicroRNAs Is Required for Enhanced Viral Replication. *J Virol.* 2015;90: 1788–801. doi:10.1128/JVI.02246-15
64. Hiraiwa N, Hiraiwa M, Kannagi R. Human T-cell leukemia virus-1 encoded Tax protein transactivates alpha 1-->3 fucosyltransferase Fuc-T VII, which synthesizes sialyl Lewis X, a selectin ligand expressed on adult T-cell leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;231: 183–6. doi:10.1006/bbrc.1997.6068
65. Theocharis AD, Karamanos NK. Proteoglycans remodeling in cancer: Underlying molecular mechanisms. *Matrix Biol.* 2017; doi:10.1016/j.matbio.2017.10.008
66. Hirsch I, Janovec V, Stranska R, Bendriss-Vermare N. Cross Talk between Inhibitory Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif-Signaling and Toll-Like Receptor Pathways in Macrophages and Dendritic Cells. *Front Immunol.* 2017;8: 394. doi:10.3389/fimmu.2017.00394
67. Smith N, Pietrancosta N, Davidson S, Dutrieux J, Chauveau L, Cutolo P, et al. Natural amines inhibit activation of human plasmacytoid dendritic cells through CXCR4 engagement. *Nat Commun.* 2017;8: 14253. doi:10.1038/ncomms14253
68. Simon V, Bloch N, Landau NR. Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape. *Nat Immunol.* 2015;16: 546–53. doi:10.1038/ni.3156
69. Bego MG, Cote E, Aschman N, Mercier J, Weissenhorn W, Cohen EA. Vpu Exploits

- the Cross-Talk between BST2 and the ILT7 Receptor to Suppress Anti-HIV-1 Responses by Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLoS Pathog.* 2015;11: e1005024. doi:10.1371/journal.ppat.1005024
70. Ilinskaya A, Derse D, Hill S, Princler G, Heidecker G. Cell-cell transmission allows human T-lymphotropic virus 1 to circumvent tetherin restriction. *Virology.* 2013;436: 201–9. doi:10.1016/j.virol.2012.11.012
71. Jegouzo SA, Feinberg H, Dungarwalla T, Drickamer K, Weis WI, Taylor ME. A Novel Mechanism for Binding of Galactose-terminated Glycans by the C-type Carbohydrate Recognition Domain in Blood Dendritic Cell Antigen 2. *J Biol Chem.* 2015;290: 16759–71. doi:10.1074/jbc.M115.660613
72. Riboldi E, Daniele R, Parola C, Inforzato A, Arnold PL, Bosisio D, et al. Human C-type lectin domain family 4, member C (CLEC4C/BDCA-2/CD303) is a receptor for asialo-galactosyl-oligosaccharides. *J Biol Chem.* 2011;286: 35329–33. doi:10.1074/jbc.C111.290494
73. Bloem K, Vuist IM, van den Berk M, Klaver EJ, van Die I, Knippels LM, et al. DCIR interacts with ligands from both endogenous and pathogenic origin. *Immunol Lett.* 2014;158: 33–41. doi:10.1016/j.imlet.2013.11.007
74. Bloem K, Vuist IM, van der Plas AJ, Knippels LM, Garssen J, Garcia-Vallejo JJ, et al. Ligand binding and signaling of dendritic cell immunoreceptor (DCIR) is modulated by the glycosylation of the carbohydrate recognition domain. *PLoS One.* 2013;8: e66266. doi:10.1371/journal.pone.0066266
75. Jahn PS, Zanker KS, Schmitz J, Dzionek A. BDCA-2 signaling inhibits TLR-9-agonist-induced plasmacytoid dendritic cell activation and antigen presentation. *Cell Immunol.* 2010;265: 15–22. doi:10.1016/j.cellimm.2010.06.005
76. Martinelli E, Cicala C, Van Ryk D, Goode DJ, Macleod K, Arthos J, et al. HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN- $\alpha$  secretion in plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104: 3396–401. doi:10.1073/pnas.0611353104
77. Florentin J, Aouar B, Dental C, Thumann C, Firaguay G, Gondois-Rey F, et al. HCV glycoprotein E2 is a novel BDCA-2 ligand and acts as an inhibitor of IFN production by plasmacytoid dendritic cells. *Blood.* 2012;120: 4544–51. doi:10.1182/blood-2012-02-413286
78. Morozov VA, Weiss RA. Two Types of HTLV-1 Particles Are Released from MT-2 Cells. *Virology.* 1999;255: 279–284.
79. Bunn PA, Foss FM. T-Cell lymphoma cell lines (HUT102 and HUT78) established at the National Cancer Institute: History and importance to understanding the biology, clinical features, and therapy of cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) and adult T-cell leukemia-lymphomas (ATLL). *J Cell Biochem.* 1996;63: 12–23. doi:10.1002/jcb.240630503
80. Mahieux R, Pise-Masison CA, Lambert PF, Nicot C, De Marchis L, Gessain A, et al. Differences in the Ability of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 Tax To Inhibit p53 Function. *J Virol.* 2000;74: 6866–6874. doi:10.1128/JVI.74.15.6866-6874.2000
81. Uze G, Di Marco S, Mouchel-Vielh E, Monneron D, Bandu MT, Horisberger MA, et al. Domains of interaction between alpha interferon and its receptor components. *J Mol Biol.* 1994;243: 245–57. doi:10.1006/jmbi.1994.1651

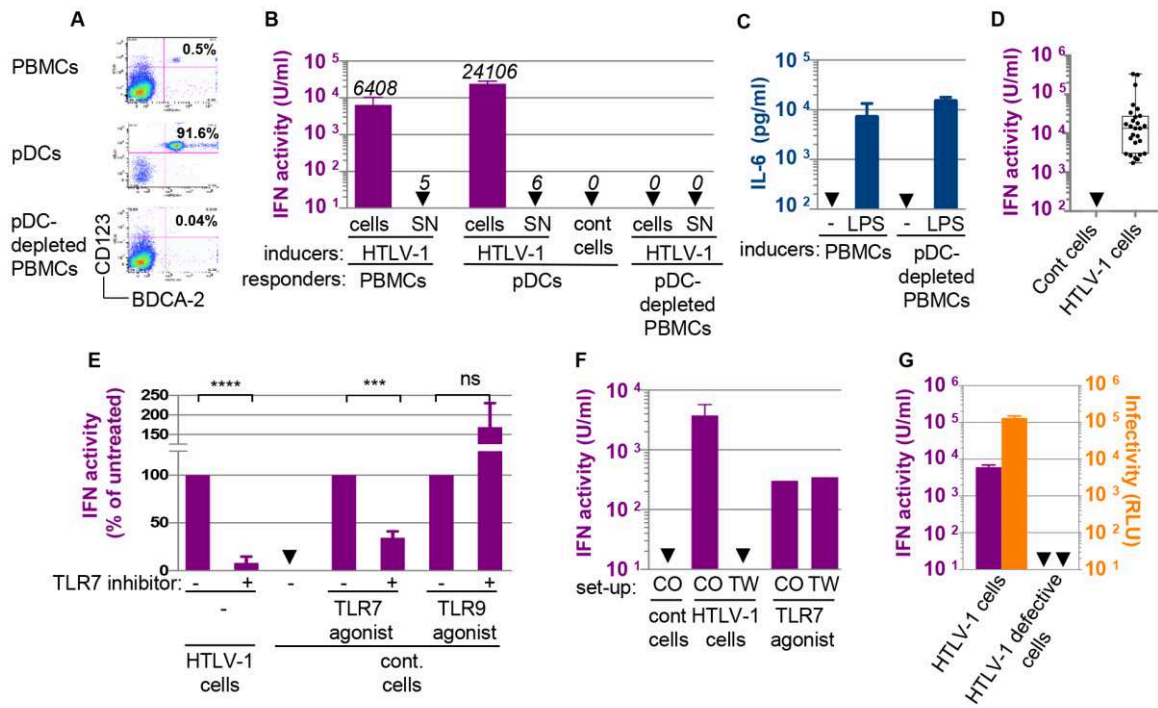
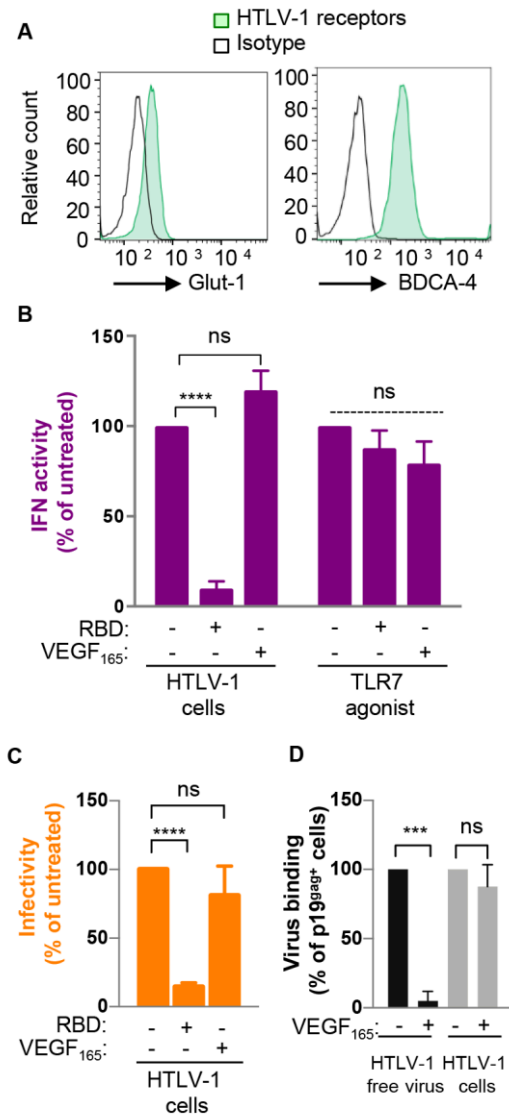
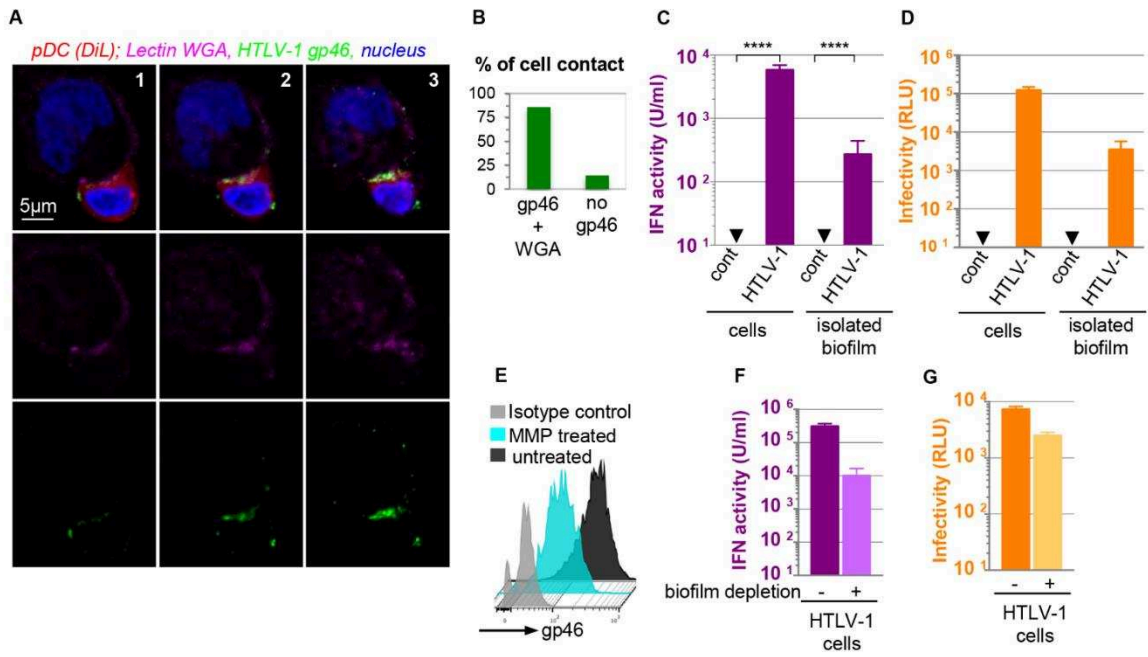


Figure 1

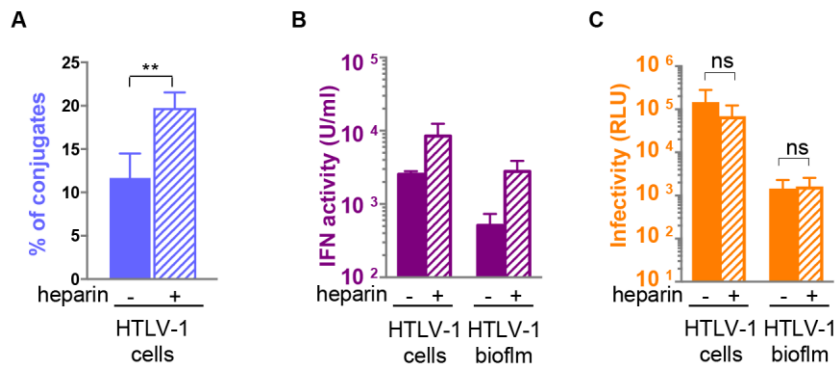


**Figure 2**

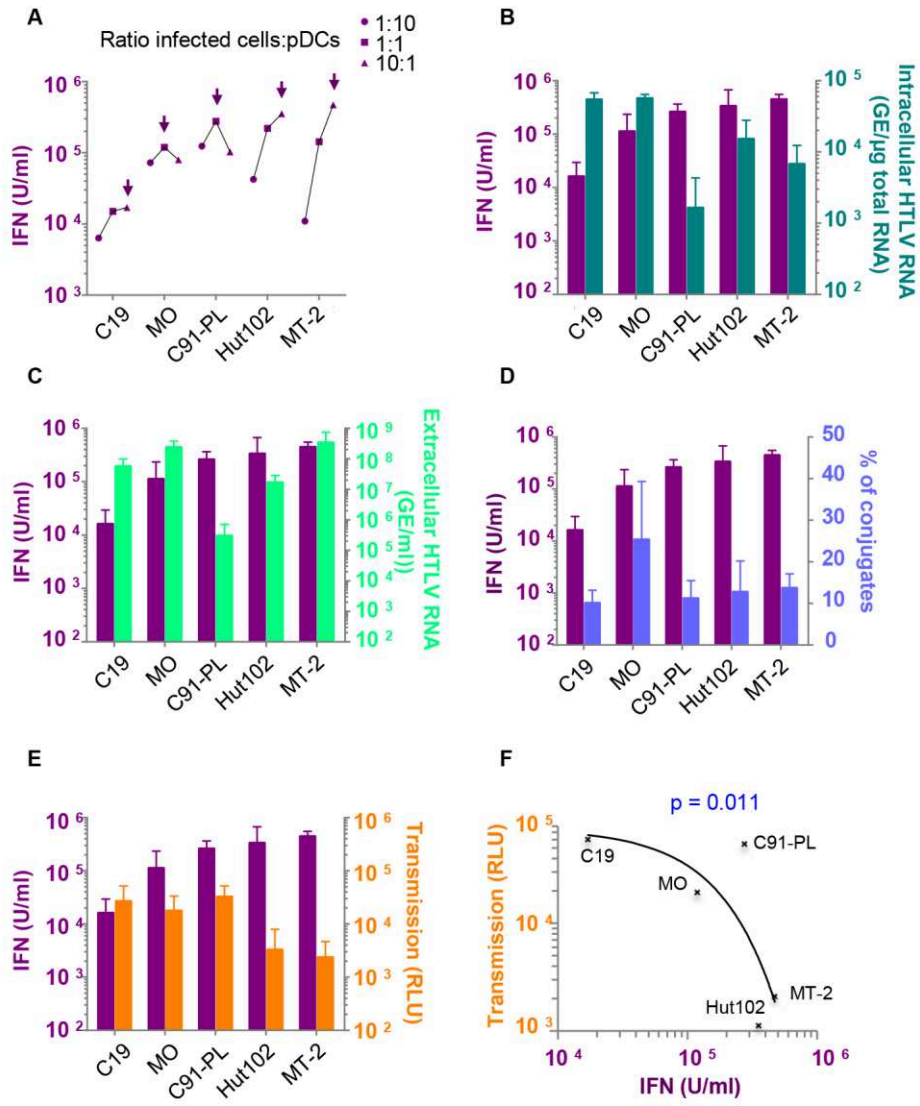


**Figure 3**





**Figure 4**



**Figure 5**

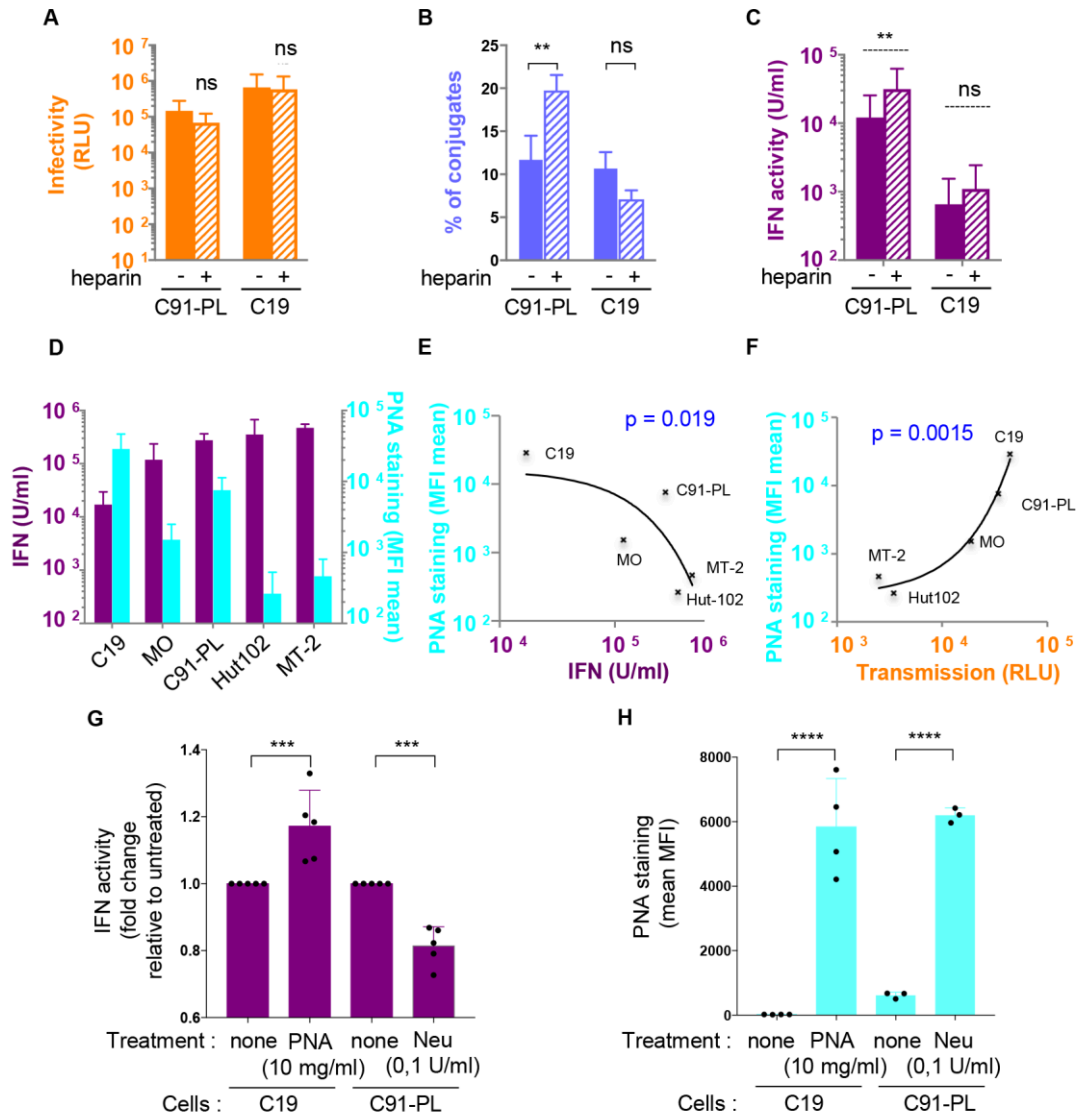
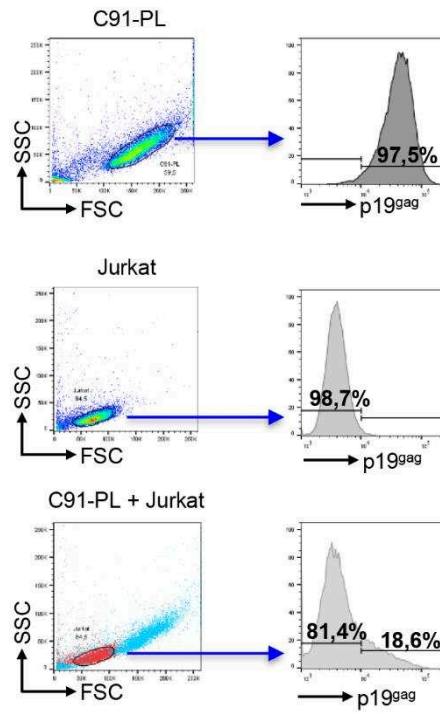
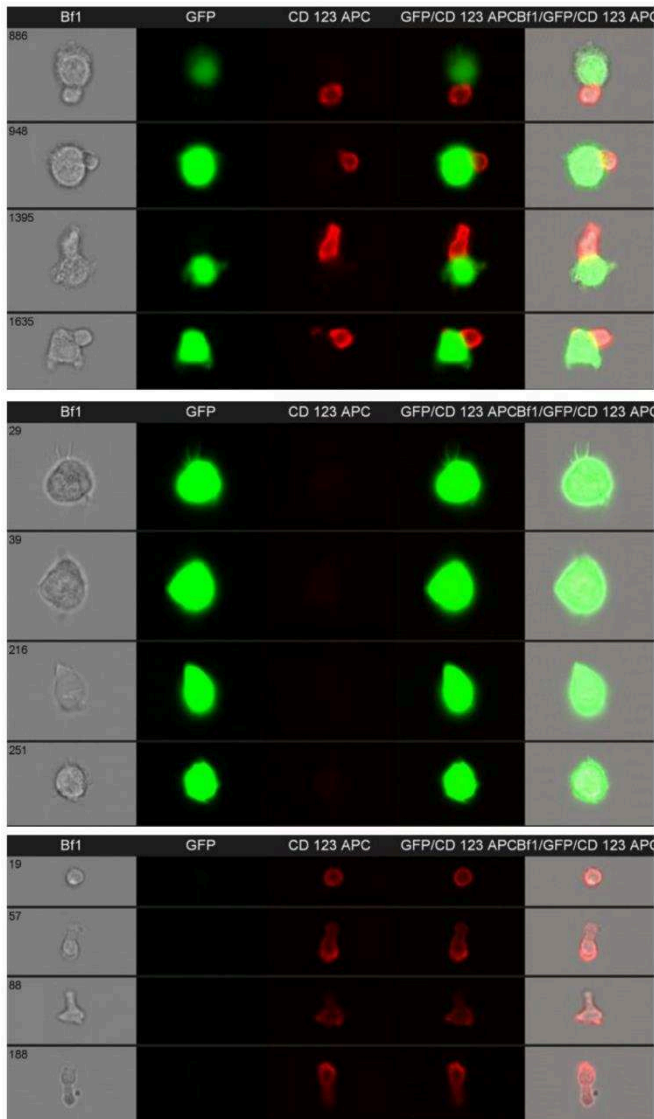
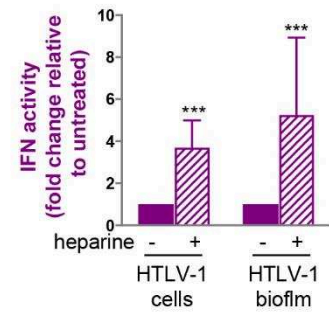
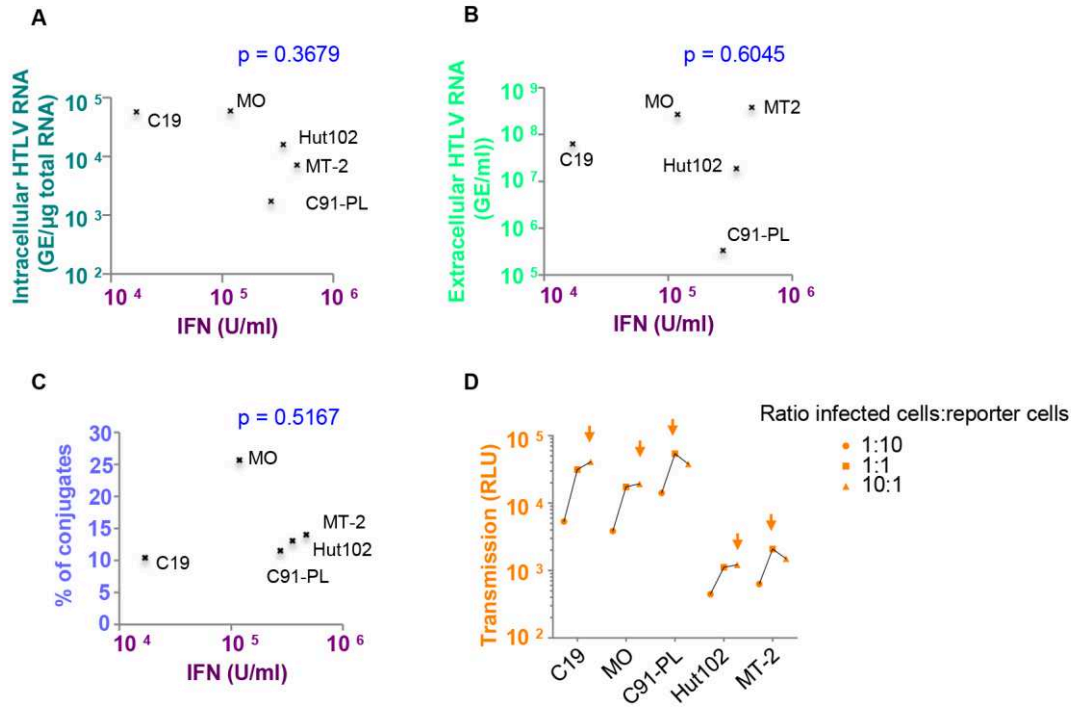


Figure 6

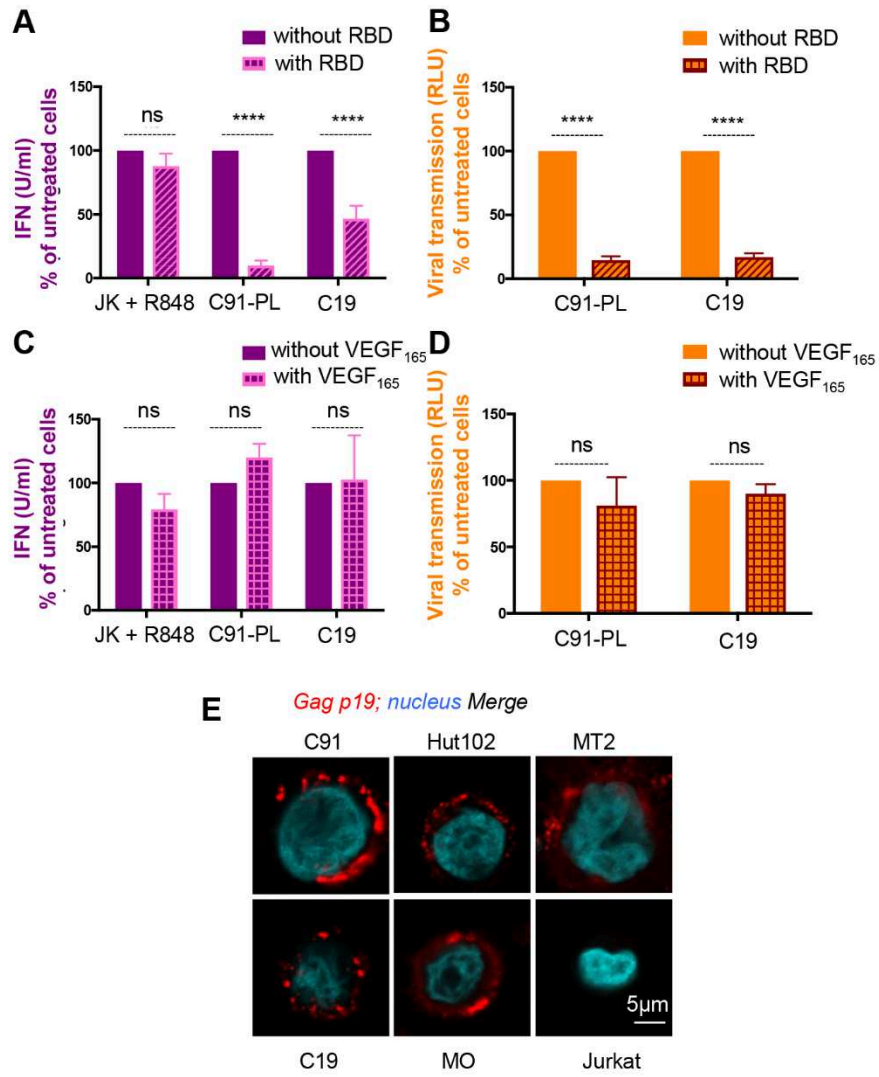


**Supplementary Figure 1**

**A****B****Supplementary Figure 2**



Supplementary Figure 3

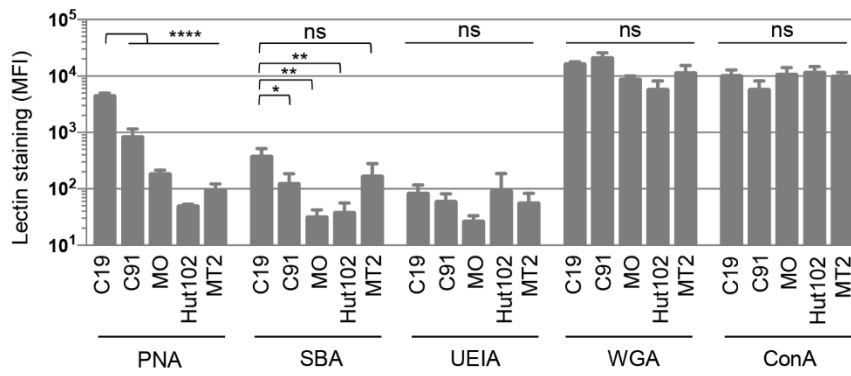


Supplementary Figure 4

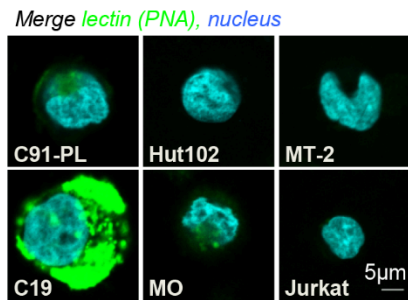
**A**

	Name	Ligand
<b>PNA</b>	Peanut agglutinin	Gal $\beta$ 3GalNAc
<b>SBA</b>	SoyBean agglutinin	$\alpha$ > $\beta$ 3GalNAc
<b>WGA</b>	Wheat Germ agglutinin	GlcNAc
<b>UEIA</b>	Ulex europaeus I agglutinin	$\alpha$ Fuc
<b>ConA</b>	Concanavalin A	$\alpha$ Man, $\alpha$ Glc

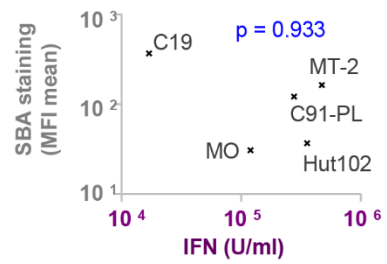
**B**



**C**



**D**



**Supplementary Figure 5**



## **1.2. Résultats complémentaires**

### **1.2.1. Introduction**

Ces résultats font directement suite à l'article précédent et s'ancrent dans la compréhension du mécanisme qui peut conduire les cellules C19 à induire une réponse IFN-I plus faible après leur reconnaissance par les pDCs. Pour cela, nous avons voulu déterminer si ce résultat est associé à un défaut d'activation de la pDC par les cellules C19 ou à un mécanisme spécifique de l'inhibition de la réponse IFN-I, dépendant ou non du contact cellulaire. Nous avons également investigué si l'IFN-I produit par les pDCs après coculture avec les différentes lignées infectées par HTLV-1 et HTLV-2 présente des propriétés antivirales, au même titre que l'IFN- $\alpha$  recombinant.

### **1.2.2. Matériels et méthodes**

#### **Cellules et milieux de culture**

Les cellules chroniquement infectées par HTLV-1 (C91-PL, Hut102, MT-2) et cellules Jurkat sont cultivées dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) (Gibco) supplémenté de sérum de veau fœtal (SVF) (10 %) (BioSera) et de pénicilline/streptomycine (1 %) (Gibco). Les cellules chroniquement infectées par HTLV-2 (C19 et MO) sont cultivées dans du milieu RPMI supplémenté de SVF (20 %) et de pénicilline/streptomycine (1 %). Les cellules HL116 sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté de SVF (10 %), de pénicilline/streptomycine (1 %) et de HAT (Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine) (1x) (Gibco). Des PBMCs de donneurs sains sont isolées à partir d'anneaux de cytophère obtenus auprès de l'établissement français du sang par centrifugation sur un coussin de Ficoll (GE Healthcare). Les pDCs sont ensuite isolées de ces PBMCs après purification par tri magnétique à l'aide d'un anticorps dirigé contre BDCA-4 (Milteniy). Les pDCs sont resuspendues dans du milieu RPMI supplémenté de sérum de veau fœtal (10 %) et de pénicilline/streptomycine (1 %), d'HEPES (10 mM) (Gibco), d'acides aminés non essentiels (1x) (Gibco) et de pyruvate de sodium (1mM) (Gibco). Les cellules sont cultivées à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>.

### **Stimulation des pDCs par HTLV-1 et HTLV-2 et mesure de l'IFN-I**

Les pDCs sont cultivées au ratio 1:1 avec des cellules infectées ou des Jurkat (20 000 vs 20 000 ou 100 000 vs 100 000, pour la production d'IFN-I ou les expériences d'immunomarquage, respectivement), du surnageant de cellules C19, du R848 (0.35  $\mu$ M sauf indication) (Invivogen) ou du CpG (10  $\mu$ g/mL) (Invivogen) pendant 24h à 37°C 5 % CO<sub>2</sub> en plaque 96 puits à fond rond. Les pDCs sont ensuite centrifugées et le surnageant collecté et conservé à -20°C avant dosage. Le dosage du surnageant est réalisé à l'aide des cellules rapportrices HL116, qui expriment le gène de la luciférase dont l'expression est contrôlée par un promoteur contenant des séquences ISRE (Uzé et al., 1994). Le surnageant des cellules C19 correspond à du milieu de culture obtenu après 24h de culture et filtré (pores = 0.45  $\mu$ m) (Millex). Dans certaines conditions, les pDCs sont pré-incubées avant culture avec un antagoniste de TLR-7, IRS661 (0.35  $\mu$ M) (MWG Biotech), pendant 20 minutes à température ambiante.

### **Immunomarquages et cytométrie**

Après 24h de coculture, les cellules sont lavées avec du DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) 1x (Gibco), resuspendues dans un tampon DPBS / BSA (Bovine Serum Albumin) 1 % (Sigma) avec l'un ou l'autre des mix d'anticorps monoclonaux suivants : anti-BDCA-4-FITC (Clone AD5-17F6 Milteniy), CD123-Vioblue (Clone AC145 Milteniy), BDCA-2-APC (Milteniy), TRAIL-PE (eBiosciences) ou bien anti-BDCA-4-FITC (Clone AD5-17F6 Milteniy), CD123-PE (Clone AC145 Milteniy), CD40-PECy7 (Clone 5C3 BD Biosciences), HLA-DR-PerCP (BD Biosciences), CD86-APC (BD Biosciences). Le marquage est réalisé à 4°C pendant 20 minutes selon les instructions du fournisseur. Les cellules sont ensuite lavées avec du DPBS 1x et fixées avec 4 % de paraformaldéhyde (Electron Microscopy Sciences) pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées avec du DPBS 1x et le marquage analysé par cytométrie en flux (Canto II BD Biosciences).

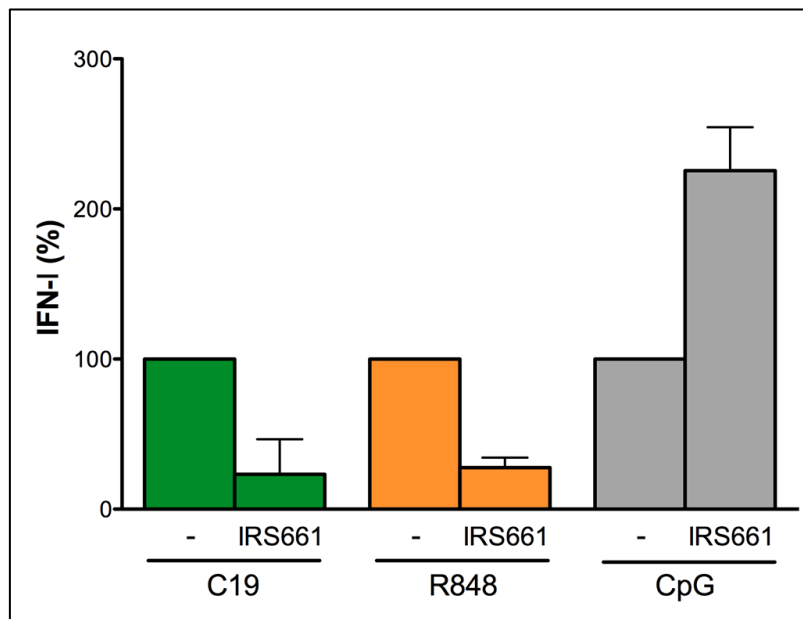
### **Effet antiviral de l'IFN-I sur la néoinfection**

2.10<sup>6</sup> de cellules Jurkat sont microporées (Neon, Thermo Fisher Scientific) avec 10 $\mu$ g d'un plasmide rapporteur de l'infection LTR-Luciférase (Cachat et al., 2013). Les cellules Jurkat sont ensuite cultivées pendant 24h à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> avec des concentrations croissantes d'IFN-I (10, 100 ou 1000 U/mL) produit par les pDCs après stimulation par le R848 ou les cellules infectées par HTLV-1-/2. Les cellules Jurkat sont ensuite cocultivées avec des cellules C91-PL au ratio 1:1 (100 000 vs 100 000) en plaque 96 puits à fond rond pendant 24h supplémentaires. Les cellules sont ensuite lavées et lysées dans du tampon de lyse passif 1x

(Promega) et l'activité de la luciférase est mesurée après addition de son substrat (Promega) à l'aide d'un luminomètre (Glomax Turner Biosystems). Le niveau de luciférase dans chaque puits est normalisé par rapport à la quantité de protéines mesurée par le test de Bradford (BioRad).

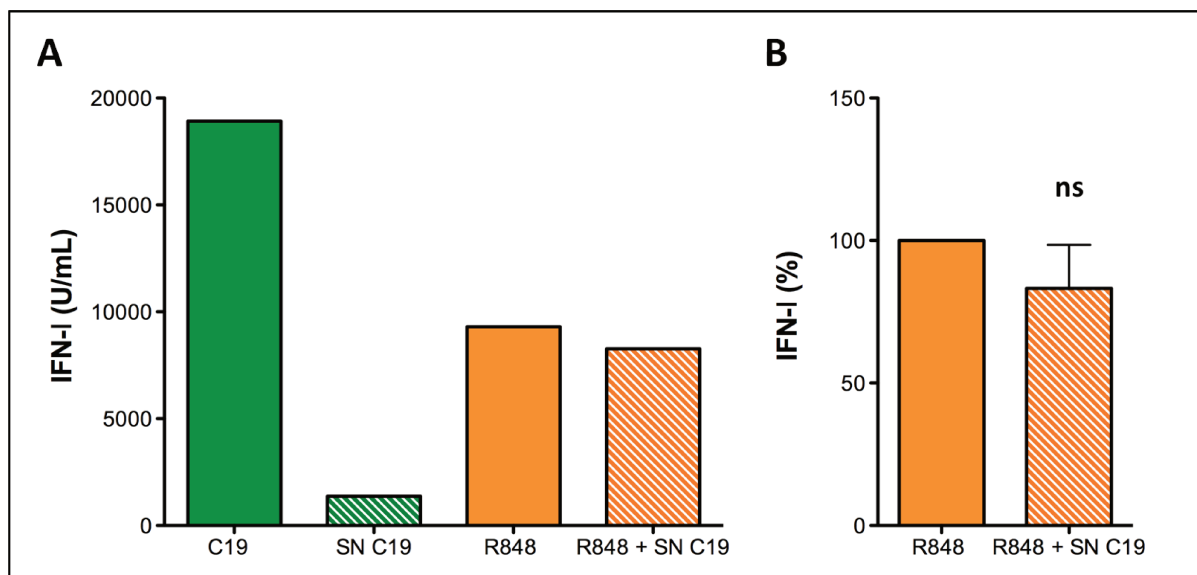
### 1.2.3. Résultats

Dans un premier temps, nous avons évalué si la lignée C19 est capable, au même titre que la lignée C91-PL (**Figure 1E de l'article**), d'induire la signalisation TLR-7 au niveau de la pDC après coculture. Pour cela, nous avons incubé les pDCs avec un antagoniste de TLR-7, l'IRS661, avant la coculture avec la lignée C19. Le niveau d'IFN-I dans le surnageant est réduit en présence de l'IRS661, ce qui indique que le virus HTLV-2 est également reconnu par la pDC à travers TLR-7 (**Figure 32**). L'effet de l'IRS661 est spécifique puisque cette molécule induit également une inhibition de la production d'IFN-I médiée par un agoniste de TLR-7 (R848) mais pas par un agoniste de TLR-9 (CpG) (**Figure 32**).



**Figure 32** : L'activation de la pDC par la lignée C19 est dépendante de TLR-7. Les pDCs ont été cocultivées avec des cellules C19 au ratio 1:1, du R848 ou du CpG pendant 24h en présence ou en absence d'un antagoniste de TLR-7 : IRS661 (0.35  $\mu$ M). La quantité d'IFN-I dans le surnageant a ensuite été mesurée à l'aide de la lignée rapportrice HL116 et exprimée sous la forme de pourcentage d'IFN-I (U/mL) par rapport à la condition sans IRS661 (n=2).

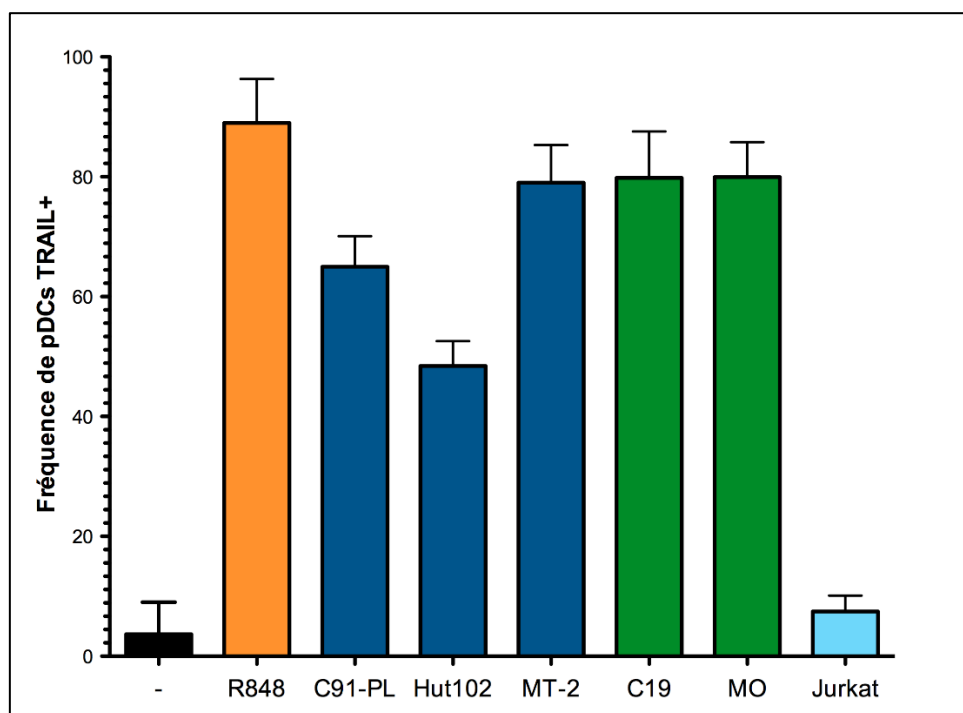
Dans un second temps, nous avons évalué si un élément contenu dans le surnageant de culture de la lignée C19 pouvait induire une inhibition de la production d'IFN-I par la pDC, tel que le virus lui-même par exemple, puisqu'il a été montré que certaines glycoprotéines virales peuvent inhiber la réponse IFN-I après leur interaction avec des récepteurs à la surface de la pDC (Florentin et al., 2012 ; Martinelli et al., 2007). Pour vérifier cela, nous avons stimulé des pDCs avec du R848 puis les avons simultanément cultivées en présence ou en absence de surnageant de culture de la lignée C19. Le surnageant lui-même est capable d'induire une production d'IFN-I par la pDC, bien que l'amplitude de la réponse soit inférieure à ce qui est obtenu par un contact cellule-cellule (Figure 33A). En revanche, le surnageant ne diminue pas ou peu la réponse IFN-I induite par le R848 (Figure 33A-B). Ceci suggère que la plus faible réponse IFN-I de la pDC après coculture avec la lignée C19 n'est pas associée à une inhibition par le virus libre ou un autre élément produit par les cellules C19 (cytokines, hormones).



**Figure 33** : Le surnageant de la lignée C19 ne suffit pas à reproduire la plus faible activation des pDCs par ces cellules. Les pDCs sont cultivées en présence de cellules C19 au ratio 1:1 (C19), du surnageant de ces cellules (SN C19) (100  $\mu$ L de surnageant pour 20 000 pDCs) ou d'un agoniste de TLR-7 (R848) pendant 24h. La quantité d'IFN-I (U/mL) dans le surnageant a ensuite été mesurée à l'aide de la lignée rapportrice HL116. **A**) Résultat représentatif d'une expérience. **B**) Représentation du pourcentage d'inhibition induit par la combinaison du R848 avec le surnageant des cellules C19 (n=3). Le test statistique correspond à un test de Wilcoxon (ns = non significatif).

Le virus libre de HTLV-1, en plus de stimuler la production d'IFN- $\alpha$ , est capable d'induire la relocalisation de la protéine TRAIL à la membrane plasmique de la pDC et d'induire l'expression de marqueurs de maturations, tels que CD40 ou CD86 (Colisson et al., 2010). Pour

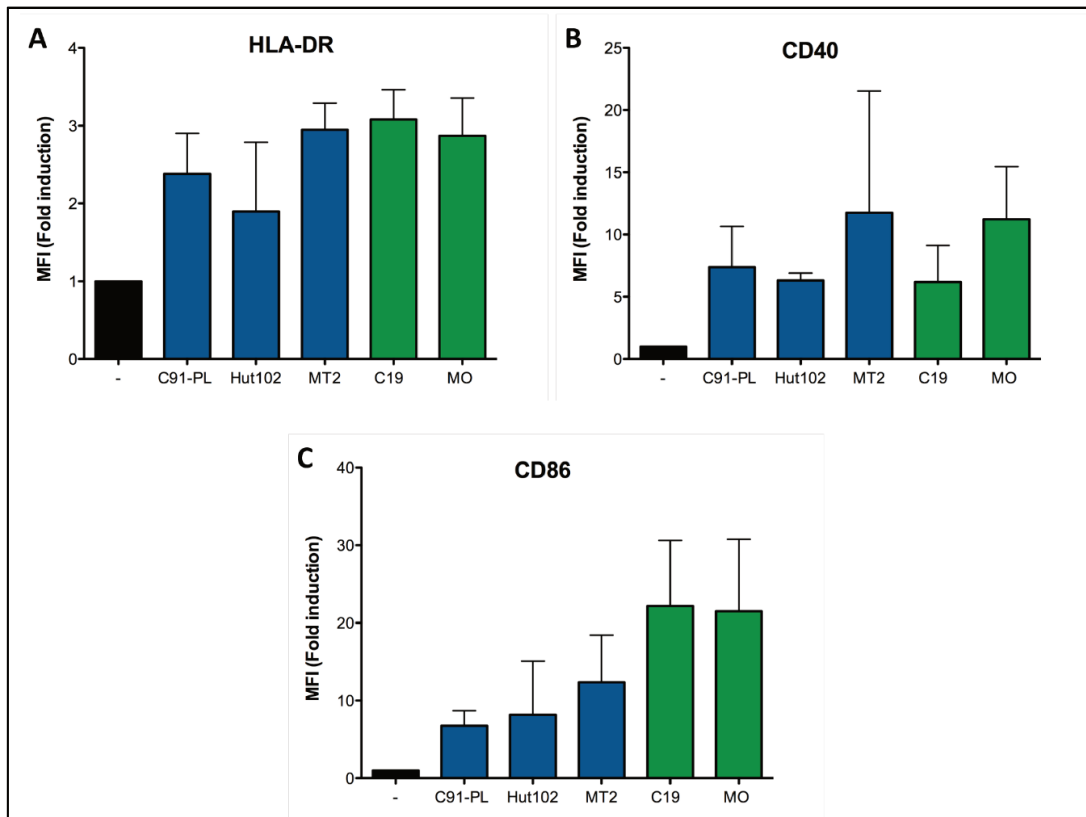
contrôler si la plus faible production d'IFN-I par les pDCs après reconnaissance des cellules C19 n'est pas simplement associée à un défaut d'activation de la pDC, nous avons évalué l'expression de surface des protéines TRAIL, CD40, CD86 et HLA-DR au niveau des pDCs stimulées par différentes lignées infectées par HTLV-1 (C91-PL, Hut102, MT-2) ou HTLV-2 (C19, MO). Nous avons observé que l'expression de TRAIL à la membrane plasmique des pDCs peut être induite à la fois par du R848 et par des cellules infectées par HTLV-1 et HTLV-2 (**Figure 34**). Si la fréquence des pDCs exprimant TRAIL après coculture varie en fonction des lignées, celle-ci est à la fois maximale et similaire pour les lignées MT-2, C19 et MO, ce qui indique que la lignée C19 n'est pas déficiente dans l'activation des pDCs.



**Figure 34** : La stimulation des pDCs par des cellules infectées par HTLV-1 et HTLV-2 induit l'expression de TRAIL. L'expression de TRAIL à la surface des pDCs a été mesurée par cytométrie en flux et exprimée sous la forme de la fréquence de pDCs qui expriment TRAIL après coculture avec des doses croissantes de R848, des lignées cellulaires infectées par HTLV-1 et HTLV-2 ou des cellules Jurkat non infectées pendant 24h au ratio 1:1 (n=6).

En parallèle de TRAIL, la coculture de cellules infectées par HTLV-1 et HTLV-2 avec les pDCs induit également une maturation de ces dernières, avec une induction de l'expression de CD40, CD86 et HLA-DR (**Figure 35**). Les cellules C19 ne sont pas déficientes dans l'induction de l'expression des récepteurs CD40 et HLA-DR en surface des pDCs, en comparaison des autres lignées (**Figure 35A-B**). De manière intéressante, l'expression de CD86 par les pDCs paraît

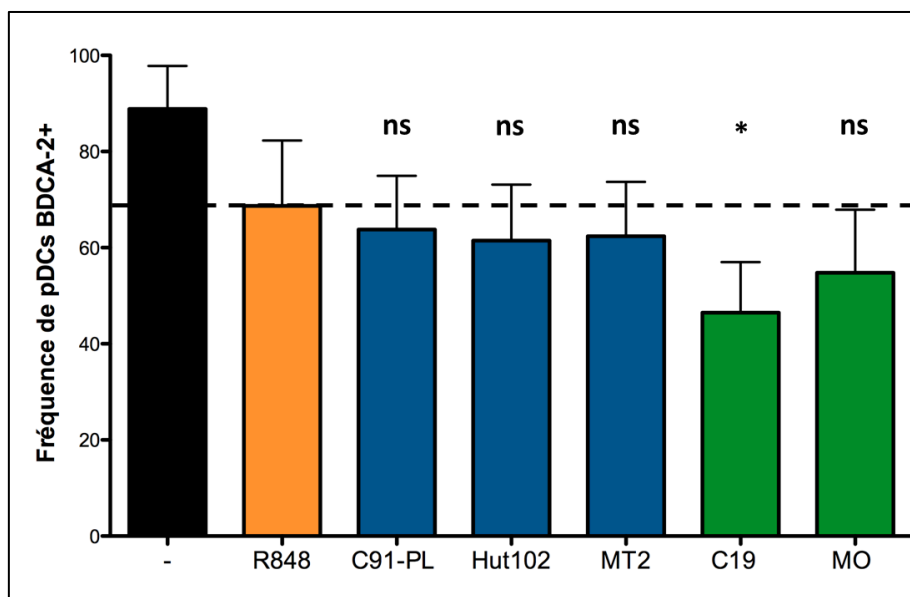
plus élevée après une stimulation par HTLV-2 que par HTLV-1, indépendamment de la lignée infectée (**Figure 35C**).



**Figure 35** : La stimulation des pDCs par des cellules infectées par HTLV-1 et HTLV-2 induit l'expression de marqueurs de maturation. Les pDCs sont cocultivées 24h avec des lignées cellulaires infectées par HTLV-1 et HTLV-2. L'expression de CD40, CD86 et HLA-DR à la surface des pDCs a été mesurée par cytométrie en flux et exprimée sous la forme du ratio entre la médiane d'intensité de fluorescence (MFI) obtenue pour chaque stimulation et la MFI obtenue en absence de stimulation des pDCs (= Fold induction) (n=2 pour CD40 et n= 3 pour HLA-DR et CD86).

Précédemment, nous avons observé que l'exposition du motif Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc (Galactose  $\beta$ (1-3) N-acétylgalactosamine), aussi appelé antigène TF (Thomsen-Friedenreich), à la surface des cellules infectées influence la production d'IFN-I par les pDCs (**Figure 6G de l'article**). Nous avons émis l'hypothèse que l'exposition de ce motif glycosylé pouvait induire l'activation de récepteurs régulateurs à la surface de la pDC, comme par exemple BDCA-2, qui est capable de reconnaître des groupements glycosylés avec des galactoses terminaux (Jégouzo et al., 2015). Puisque l'internalisation de BDCA-2 est observée en parallèle de son activation (Pellerin et al., 2015), nous avons mesuré l'expression de ce marqueur par les pDCs après coculture avec les différentes lignées HTLV-1 et HTLV-2. Nous avons observé que la fréquence de pDCs

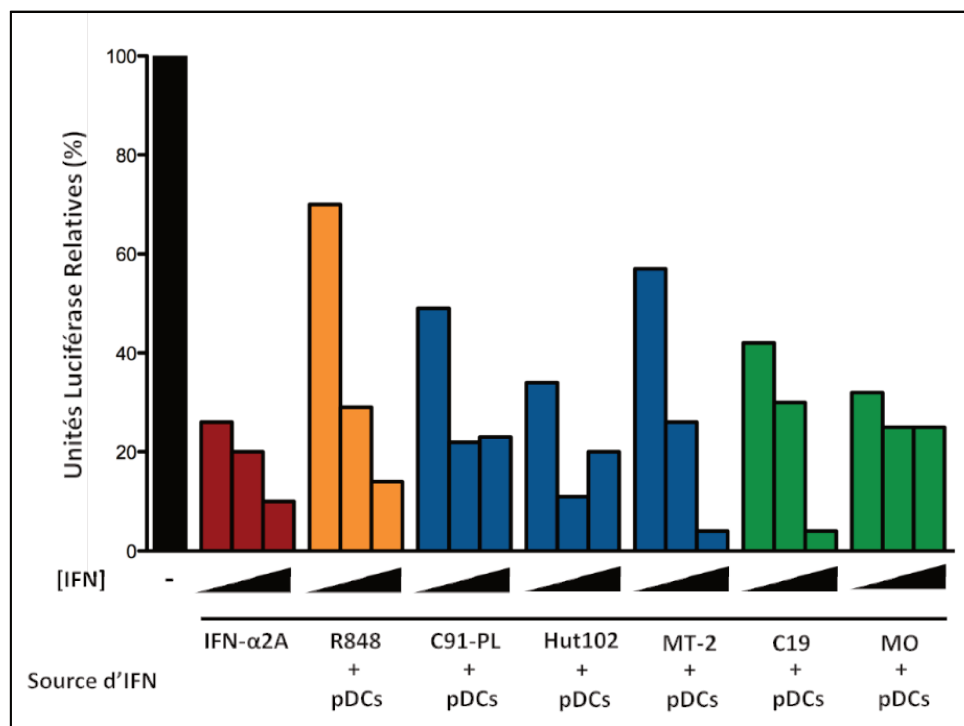
exprimant BDCA-2 en surface (le protocole de marquage se faisant en absence de perméabilisation membranaire) est statistiquement inférieure après coculture avec la lignée C19 en comparaison de toutes les autres lignées, en prenant comme référentiel le niveau obtenu après une stimulation avec du R848 (**Figure 36**). Ceci suggère que le récepteur BDCA-2 est internalisé de manière accrue après stimulation par les cellules C19. Au vu de sa capacité à inhiber la production d'IFN-I (Pellerin et al., 2015), nous avons émis l'hypothèse que les cellules C19 sont capables de stimuler BDCA-2, ce qui expliquerait la capacité réduite de ces cellules à induire la production d'IFN-I par les pDCs.



**Figure 36** : L'activation des pDCs par la lignée C19 induit une diminution de la fréquence de pDCs positives pour l'expression de BDCA-2 en surface. L'expression de BDCA-2 à la surface des pDCs a été mesurée par cytométrie en flux et exprimée sous la forme de la fréquence de pDCs qui expriment BDCA-2 après coculture avec du R848 ou des lignées cellulaires infectées par HTLV-1 et HTLV-2 pendant 24h au ratio 1:1 (n=5). Le test statistique correspond à un test de Friedman (ns = non significatif, \*P-valeur < 0.05).

Enfin, si des différences de production de l'IFN-I par les pDCs en termes quantitatifs ont été observées en fonction du stimulus, nous nous sommes intéressés à savoir s'il y avait également des différences en termes qualitatifs, et plus précisément si l'IFN-I produit après un contact avec des cellules infectées par HTLV-1 et HTLV-2 avait les mêmes propriétés antivirales que l'IFN- $\alpha$  recombinant. Pour cela, nous avons évalué la capacité des IFN-I produits par les pDCs après coculture avec du R848 ou après coculture avec chaque lignée infectée par HTLV-1 et HTLV-2 à prévenir l'infection de Jurkat par des cellules infectées, à l'instar de ce qui a déjà été

observé avec de l'IFN- $\alpha$  recombinant (Cachat et al., 2013). Tous les IFN-I produits par la pDC sont capables de limiter la néoinfection de cellules Jurkat par HTLV-1, de manière dose dépendante, avec cependant des concentrations optimales d'inhibition variables en fonction de la lignée infectée (**Figure 37**). En revanche, l'IFN- $\alpha$ 2a recombinant conserve la meilleure capacité antivirale à faible concentration (10 U/ml). À la concentration intermédiaire (100 U/ml), tous les IFN induisent au minimum 70 % d'inhibition de la capacité infectieuse de HTLV-1. Si l'effet inhibiteur maximal est observé à la concentration intermédiaire pour certains IFN, à savoir ceux induits par les lignées C91-PL, Hut102 et MO, ceux induits par les lignées MT-2 et C19 ont un effet inhibiteur maximal pour la concentration la plus élevée (1 000 U/ml). Ceci suggère non seulement que des différences quantitatives, mais également qualitatives, existent entre les IFN produits par les pDCs après reconnaissance des différentes lignées HTLV-1 et HTLV-2.



**Figure 37** : Effet antiviral de l'IFN-I produit par les pDCs après coculture avec du R848 ou des lignées infectées par HTLV-1 et HTLV-2. Des cellules Jurkat ont été transfectées avec un plasmide rapporteur de l'infection virale (LTR-Luciférase) et incubées en présence de concentrations croissantes d'IFN (10, 100 et 1 000 U/mL) pendant 24h à 37°C. Cet IFN correspond soit à de l'IFN- $\alpha$ 2a recombinant, soit à de l'IFN produit par les pDCs après stimulation par du R848 (0.35  $\mu$ M) ou par des cellules infectées par HTLV-1 et HTLV-2. Les cellules Jurkat sont ensuite cultivées 24h supplémentaires avec des cellules C91-PL au ratio 1:1. L'expression de la luciférase, témoin de l'infection, a été mesurée et normalisée à la quantité de protéines par un test de Bradford. Les résultats d'infectiosité mesurés par les valeurs d'unités luciférase sont représentés sous la forme de pourcentages relatifs à la condition sans IFN. Résultat représentatif d'une expérience (n=2).



#### 1.2.4. Conclusion

Nous avons montré que le surnageant de culture des cellules C19 n'est pas suffisant pour induire une inhibition de la production d'IFN-I par les pDCs et que l'activation de ces dernières est médiée par la voie TLR-7, au même titre que la lignée C91-PL. En revanche, si HTLV-1 et HTLV-2 activent l'expression d'IFN-I dans la pDC à travers la même voie de signalisation, des expériences supplémentaires sont cependant nécessaires pour savoir si des différences d'accumulation de l'ARN viral dans les endosomes contenant TLR-7 pourraient être à l'origine de la plus faible induction de la production d'IFN-I par la lignée C19. Toutefois, les cellules C19 ne sont pas déficientes dans l'activation des pDCs puisqu'elles sont capables d'induire l'expression de CD40, CD86, HLA-DR et TRAIL à la membrane plasmique des pDCs au même titre que les autres lignées infectées. En revanche l'expression de BDCA-2 en surface des pDCs est plus faible après stimulation par les cellules C19 en comparaison des autres lignées cellulaires. Il serait donc intéressant de savoir si l'activation de BDCA-2 est bien l'élément responsable de l'inhibition de la production d'IFN-I par la lignée cellulaire C19. Nous envisageons pour cela de bloquer l'accessibilité du récepteur via l'utilisation de fragments Fab de l'anticorps monoclonal anti-BDCA-2, et qui permettent d'éviter l'activation de la signalisation sous-jacente, ou encore de vérifier l'activation du récepteur par la mesure de la phosphorylation des protéines ERK (Florentin et al., 2012). Enfin, nous avons également observé que l'IFN-I produit par les pDCs mises en contact avec les différentes lignées était capable, au même titre que l'IFN- $\alpha$  recombinant, d'inhiber la néoinfection de lymphocytes par HTLV-1.

## **2. Immunophénotypage des cellules sanguines de patients HAM/TSP**

### **2.1. Introduction**

Dans cette étude, nous avons voulu déterminer s'il y avait des différences dans la fréquence de plusieurs populations, à la fois de l'immunité innée et adaptative, ainsi que dans leur sensibilité à des stimuli exogènes, entre des patients symptomatiques, des porteurs asymptomatiques et des individus sains. Pour répondre à cette problématique nous avons mis en place une collaboration avec l'équipe du Pr. Jorge Casseb (LIM-56, Institut d'infectiologie Emílio Ribas, Sao Paulo, Brésil), localisée au Brésil, afin d'avoir accès à des échantillons d'individus infectés par HTLV-1 et d'individus sains issus de la même région géographique. Les patients symptomatiques de cette étude correspondent uniquement à des patients HAM/TSP puisque ces derniers sont beaucoup plus fréquents que les patients ATLL en Amérique du Sud. La fréquence des cellules, ainsi que la production de cytokines, ont été mesurées à partir du sang total stimulé ou non avec l'une des trois molécules suivantes : de la PHA (phytohémagglutinine), du PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate)/Ionomycine ou du R848 (Resiquimod). La PHA et le PMA/Ionomycine miment l'activation des lymphocytes par deux mécanismes distincts. La PHA étant une lectine, elle assure l'agrégation de plusieurs récepteurs glycosylés à la surface des lymphocytes, en incluant le TCR, ce qui permet son activation sous-jacente. Le PMA/Ionomycine diffuse à travers la membrane cellulaire et active directement un effecteur de la signalisation du TCR, la PKC (Protein Kinase C). L'utilisation des deux stimuli en parallèle nous permet ainsi de vérifier si des défauts de signalisation du TCR peuvent exister chez les individus infectés par HTLV-1. Ces deux stimulations sont utilisées pour suivre l'état de la réponse immunitaire adaptative. Le R848 est un agoniste de TLR-7 et de TLR-8 qui est utilisé pour suivre l'état de la réponse immunitaire innée.

### **2.2. Matériels et méthodes**

#### **Cohorte**

Les individus infectés par HTLV-1 asymptomatiques et les patients HAM/TSP participant à cette étude sont inclus dans une plus large cohorte d'individus suivis par le Pr. Jorge Casseb à Sao Paulo (Brésil). 15 donneurs sains, 15 individus infectés par HTLV-1 asymptomatiques et 15 patients HAM/TSP ont été recrutés pour cette étude. Tous les individus ont consenti à participer à cette étude expérimentale par écrit et ont plus de 18 ans.

### **Charge provirale**

La charge provirale des individus infectés asymptomatiques et symptomatiques a été mesurée par nos collaborateurs comme décrit précédemment (Dehée et al., 2002).

### **Stimulation des cellules du sang**

Le sang des individus est collecté dans des tubes à héparine, distribué dans des tubes en polypropylène (1.5 mL par tube), supplémenté avec 200 µL de milieu RPMI contenant 10 % de SVF et stimulé ou non avec du R848 (Invivogen) (1 ou 10 µg/mL), de la PHA (Sigma) (50 µg/mL) ou de la PMA (Sigma) (10 ng/mL)/Ionomycine (Sigma) (1 µg/mL). Le sang est incubé 1 heure à 37°C 5 % CO<sub>2</sub>. De la bréfeldine A (Sigma) (10 µg/mL) est ensuite ajoutée dans chaque tube pour une étape d'incubation de 4 heures à 37°C 5 % CO<sub>2</sub>. Le sang est alors incubé avec 10 mL de chlorure d'ammonium pendant 10 minutes à température ambiante pour lyser les globules rouges. Les cellules sont lavées avec du DPBS 1x avant immunomarquage.

### **Immunomarquage et cytométrie**

Les cellules sont incubées avec une solution de Live Dead Aqua Blue (Thermo Fisher Scientific) selon les recommandations du fournisseur. Les cellules sont lavées et incubées avec une solution de DPBS / BSA 1 % / FcR Blocking (Milteniy) pendant 15 minutes à 4°C. Les cellules sont incubées avec les mix d'anticorps décrits ci-dessous pendant 20 minutes à 4°C. Un mix d'anticorps est utilisé pour suivre les cellules de l'immunité adaptative (**Tableau 1**) (**Figure 40**) et l'autre pour suivre les cellules de l'immunité innée (**Tableau 2**) (**Figure 41**). Les concentrations d'anticorps utilisées suivent les recommandations du fournisseur.

Immunité adaptative		
Marqueur	Fluorochrome	Fournisseur
CD14	BV510	BD Biosciences
CD15		
CD19		
CD3	APC-Cy7	
TCRV $\gamma$ 9	FITC	
CD4	PE	
CD45RA	PE-CF594	
CD8	BV605	

Immunité innée		
Marqueur	Fluorochrome	Fournisseur
CD3	BV510	BD Biosciences
CD14		
CD15		
CD19		
CD56		
CD11c	PerCP-Cy5.5	
HLA-DR	APC-Cy7	
CD16	PE-CF594	
BDCA-1	PE-Cy7	
BDCA-2	BV421	
BDCA-3		

**Tableau 1 :** Panels d'anticorps utilisés pour le marquage de surface des populations immunitaires adaptatives (gauche) et innées (droite).

Les cellules sont lavées puis fixées avec du paraformaldéhyde 4 % pendant 20 minutes à température ambiante. Après fixation, les cellules sont resuspendues dans du DPBS 1x et conservées à 4°C sur la nuit. Les cellules sont ensuite resuspendues dans un tampon de perméabilisation, composé de PBS / BSA 1 % et saponine 0.05 % (Sigma), puis marquées avec les mix d'anticorps décrits ci-dessous. Les concentrations d'anticorps utilisées suivent les recommandations du fournisseur.

Immunité adaptative		
Marqueur	Fluorochrome	Fournisseur
IFN- $\gamma$	BV421	BD Biosciences
IL-17A	PerCP-Cy5.5	
IL-2	PE-Cy7	
IL-21	APC	
TNF- $\alpha$	AF700	

Immunité innée		
Marqueur	Fluorochrome	Fournisseur
IFN- $\gamma$	BV786	BD Biosciences
TNF- $\alpha$	AF700	
IL-12	PE	
MIP-1 $\alpha$	APC	
IFN- $\alpha$	FITC	Milteniy

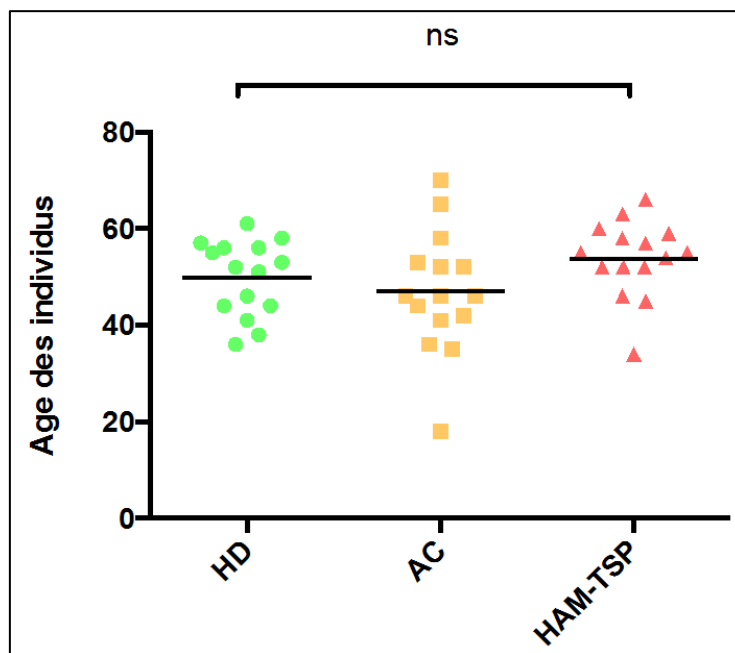
**Tableau 2 :** Panels d'anticorps utilisés pour le marquage intracellulaire des populations immunitaires adaptatives (gauche) et innées (droite).

Les cellules sont ensuite lavées avec du DPBS 1x et le marquage est analysé à l'aide d'un cytomètre LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences). Des tubes de compensation ont été préparés

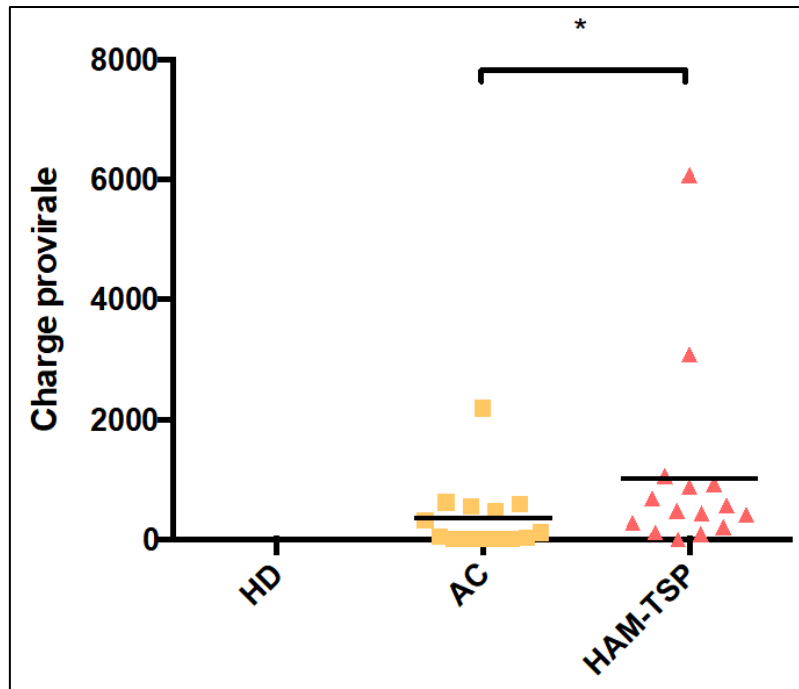
pour chaque fluorochrome à l'aide de billes de compensation (BD Biosciences), pour créer la matrice de compensation. Les données ont été traitées avec le logiciel FlowJo et la stratégie d'analyse hiérarchique des populations cellulaires réalisée à l'aide d'un contrôle FMO (Fluorescence Minus One).

### 2.3. Résultats

Dans un premier temps, nous avons vérifié qu'il n'y avait pas de différences significatives dans l'âge moyen de chaque catégorie d'individus (HD pour donneur sain, AC pour porteur asymptomatique et HAM/TSP) (**Figure 38**). Une élévation de la charge provirale chez les patients HAM/TSP est observée en comparaison de porteurs asymptomatiques (**Figure 39**), ce qui a déjà été observé dans plusieurs autres études (*Pour revue : Bangham et al., 2015*), et permet de valider notre cohorte.

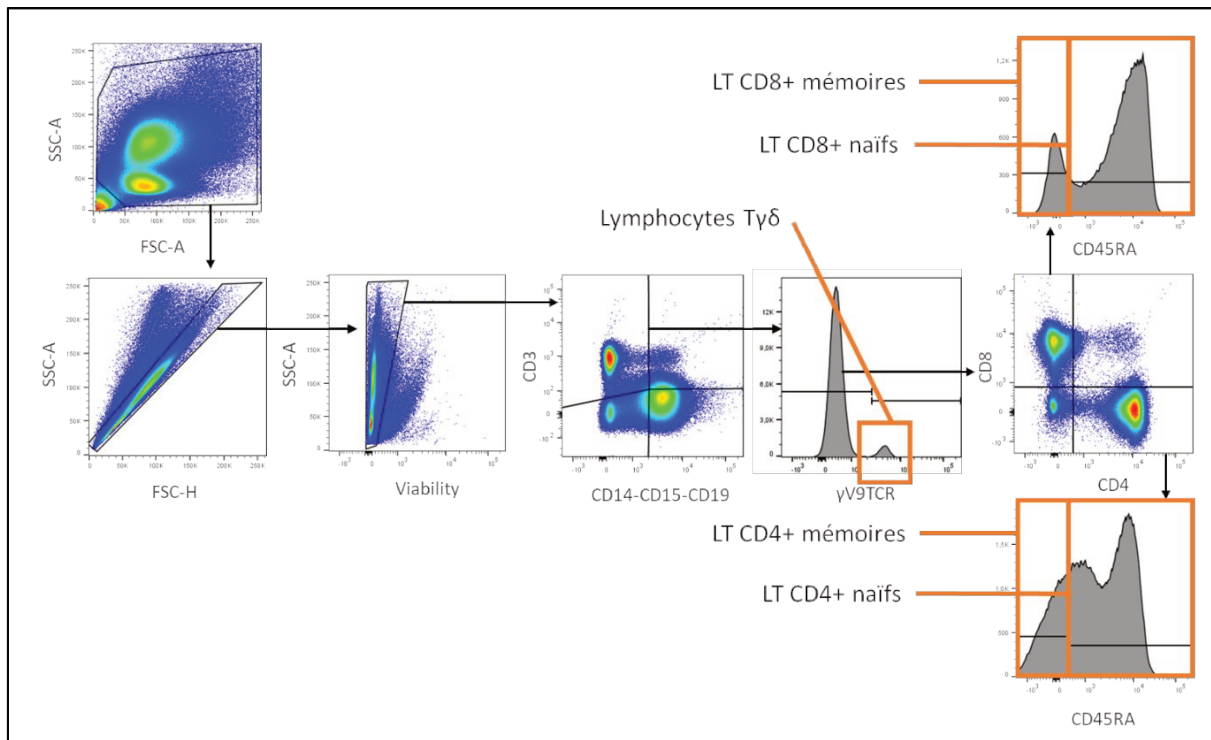


**Figure 38** : Âge des individus recrutés pour chaque catégorie clinique (HD pour donneur sain, AC pour porteur asymptomatique et HAM/TSP). Le test statistique correspond à un test de Kruskal-Wallis (ns = non significatif).



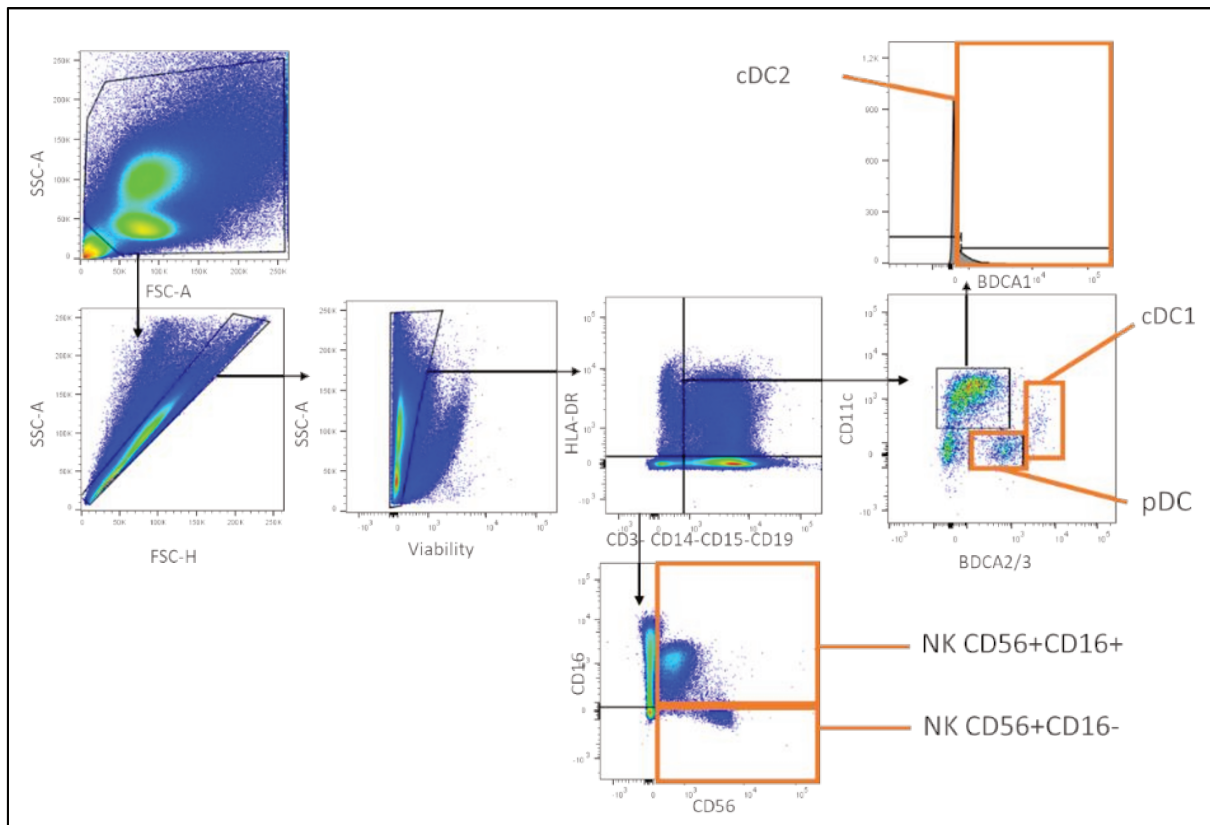
**Figure 39** : Mesure de la charge provirale des individus infectés symptomatiques et asymptomatiques. L'échelle correspond au nombre de cellules infectées pour 100 000 PBMCs. Le test statistique correspond à un test de Mann-Whitney (\*P-valeur < 0.05).

Les populations immunitaires prises en compte dans cette étude sont divisées en deux groupes et les marquages immunitaires pour les séparer sont indiqués ci-après. Ces diverses populations sont intégrées dans la mise en place ou le déroulement d'une réponse Th1, qui certes contribue à la lutte des infections intracellulaires, mais a aussi été associée au développement d'inflammations chroniques (Pour revue : Cosmi et al., 2014), et proposée comme un élément contribuant au développement de l'HAM/TSP (Araya et al., 2014). Le premier groupe représente les acteurs de l'immunité adaptative et comprend spécifiquement les lymphocytes  $T\gamma\delta$  (Lin-CD3+ $\gamma$ V9TCR+), lymphocytes T CD4+ naïfs (Lin-CD3+CD4+CD45RA+), lymphocytes T CD4+ mémoires (Lin-CD3+CD4+CD45RA-), lymphocytes T CD8+ naïfs (Lin-CD3+CD8+CD45RA+), lymphocytes T CD8+ mémoires (Lin-CD3+CD8+CD45RA-), le marqueur de lignage (Lin) correspondant à la combinaison de CD14 CD15 et CD19 (**Figure 40**).



**Figure 40** : Stratégie d'analyse hiérarchique des différentes populations cellulaires de l'immunité adaptative par cytométrie. Les cellules du sang total sont initialement triées pour enlever les débris, les doublets de cellules et les cellules mortes. Les lymphocytes T correspondent aux cellules Lin- (CD14-CD15-CD19-) CD3+. L'expression de  $\gamma$ V9TCR permet d'isoler les lymphocytes T $\gamma$  $\delta$  à l'intérieur de cette population. Les populations lymphocytaires T CD4+ et T CD8+ ont été isolées à partir des marqueurs CD4 et CD8, respectivement, le marqueur CD45RA permettant de distinguer les lymphocytes T naïfs des lymphocytes T mémoires (CD45RA négatif et CD45RA positifs respectivement). L'analyse des données de cytométrie a été réalisée à l'aide du logiciel FlowJo.

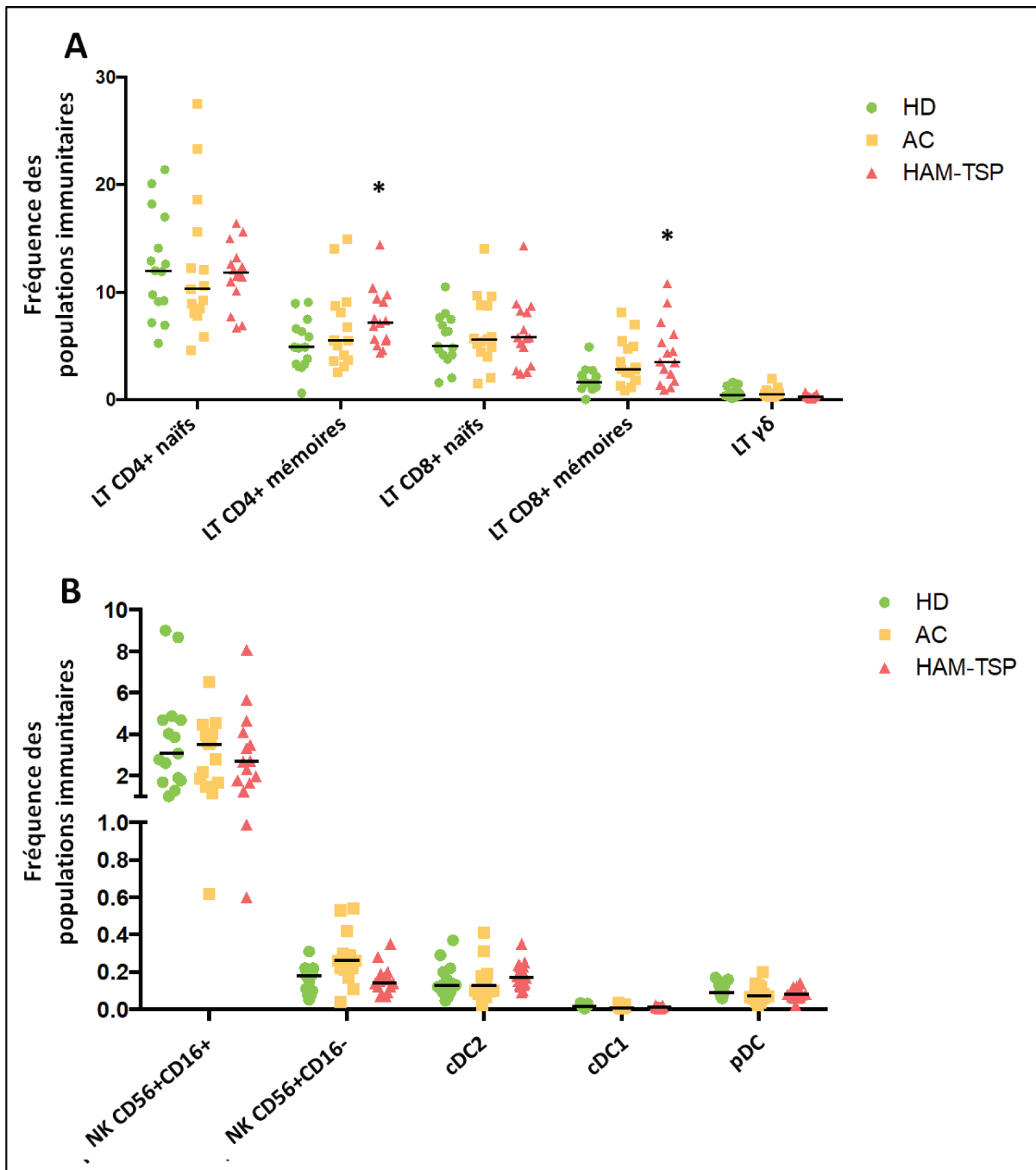
Le deuxième groupe représente les acteurs de l'immunité innée et comprend les lymphocytes NK (Lin-HLA-DR-CD56+), eux même divisés en deux groupes en fonction de l'expression de CD16, les cellules dendritiques conventionnelles 1 ou cDC1 (Lin-HLA-DR+CD11c+BDCA-3+), les cellules dendritiques conventionnelles 2 ou cDC2 (Lin-HLA-DR+CD11c+BDCA-1+) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes ou pDC (Lin-HLA-DR+CD11c-BDCA-2+) (**Figure 41**), le marqueur de lignage (Lin) correspondant à la combinaison de CD3 CD14 CD15 et CD19.



**Figure 41** : Stratégie d'analyse hiérarchique de différentes populations cellulaires de l'immunité innée par cytométrie. Les cellules du sang total sont initialement triées pour enlever les débris, les doublets de cellules et les cellules mortes. Les lymphocytes NK correspondent aux cellules Lin- (CD3-CD14-CD15-CD19-) HLA-DR-. Les lymphocytes NK sont ensuite divisés en deux populations (CD56+CD16+ et CD56+CD16-). Les cellules Lin-HLA-DR+ permettent de distinguer les pDCs (BDCA-2+CD11c-), les cDC1 (BDCA-3+CD11c+) et les cDC2 (BDCA-1+CD11c+). L'analyse des données de cytométrie a été réalisée à l'aide du logiciel FlowJo.

Dans un premier temps, nous avons déterminé s'il y avait des différences dans la fréquence de ces différentes populations immunitaires entre les trois catégories d'individus. Nous avons ainsi observé qu'il y a une augmentation statistique de la fréquence de lymphocytes T CD4+ et CD8+ mémoires circulants chez les patients HAM/TSP par rapport aux donneurs sains, tandis qu'il n'y a pas de différences entre les porteurs asymptomatiques et les donneurs sains (**Figure 42**). Une étude antérieure a observé qu'il y avait une corrélation entre le nombre absolu de lymphocytes T CD4+ ou T CD8+ mémoires circulants et la charge provirale chez les individus infectés (Yasunaga Ji et al., 2001). Ainsi, notre résultat semble pertinent puisque la charge provirale des patients HAM/TSP est plus élevée que celle des porteurs asymptomatiques (**Figure 39**). Aucune différence statistique n'a cependant été observée pour les autres populations immunitaires (**Figure 42**).

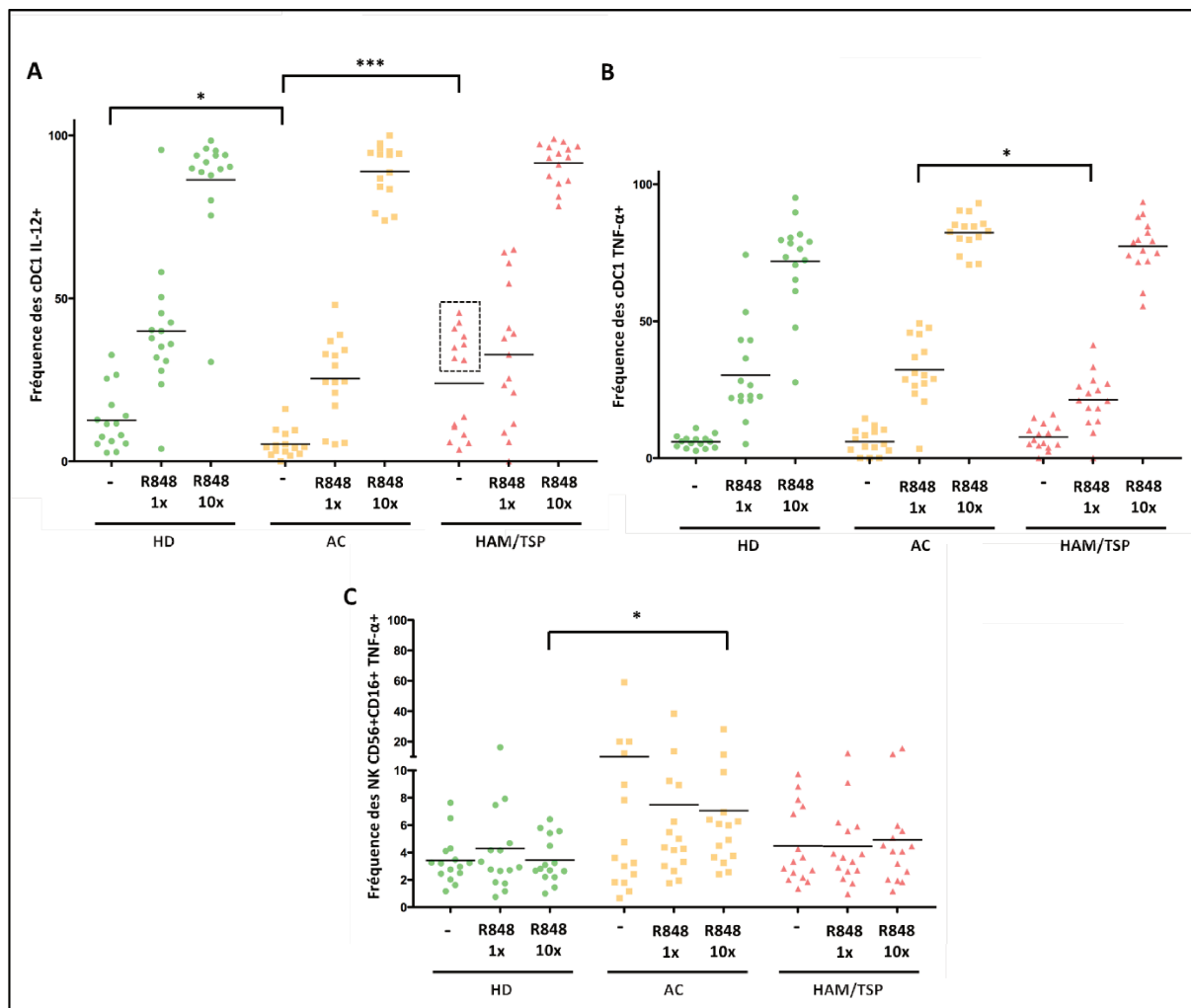




**Figure 42** : Fréquence des populations immunitaires circulantes. La valeur de l'échelle des ordonnées correspond au pourcentage de chaque population immunitaire parmi les cellules vivantes (voir stratégie de séparation en figures 3 ou 4), pour les trois groupes cliniques (HD pour donneur sain, AC pour porteur asymptomatique et HAM/TSP). Le test statistique correspond à un test de Kruskal-Wallis (\*P-valeur < 0.05).

Dans un second temps, nous avons voulu déterminer l'état de sensibilité de ces populations immunitaires à une stimulation exogène. Le sang des individus a été stimulé avec de la PHA, du PMA/Ionomycine ou du R848 et le processus de sécrétion des cytokines bloqué par l'ajout

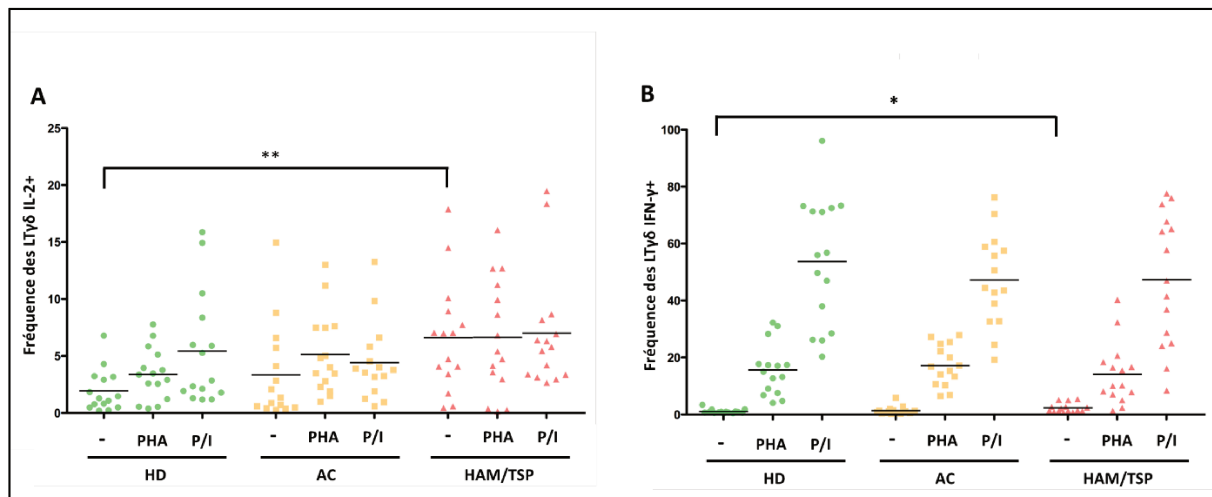
de bréfeldine A, ce qui nous permet de déterminer les niveaux intracellulaires de plusieurs cytokines produites par chacune des cellules immunitaires. Les valeurs obtenues sont exprimées selon la fréquence de cellules positives pour l'expression d'une cytokine spécifique, avec ou sans stimulation, pour les trois groupes cliniques (**Tableau 3**). Nous nous focaliserons ici sur les différences qui apparaissent comme significatives pour une population immunitaire donnée. Les niveaux d'expression d'IL-12 et de TNF- $\alpha$  par les cDC1 et les NK CD56+CD16+ sont les seuls à varier entre les trois groupes cliniques (HD, AC et HAM/TSP) dans l'analyse centrée sur la réponse innée (**Figure 43**) (**Tableau 3**). Nous observons dans un premier temps que les cDC1 de tous les groupes cliniques sont capables de répondre à une stimulation avec du R848, de façon dose-dépendante (**Figure 43A et 43B**). La fréquence de cDC1 exprimant de l'IL-12 à l'état basal est réduite chez les porteurs asymptomatiques par rapport aux individus sains (**Figure 43A**). De manière intéressante, les cDC1 des patients HAM/TSP peuvent être séparées en deux groupes, dont l'un exprimant fortement l'IL-12 à l'état basal (**Figure 43A, encadré**). L'expression de l'IL-12 par les cDC1 des individus infectés semble plus faible (bien que statistiquement non différente) que celle des individus sains lors d'une stimulation avec la dose minimale de R848 (1  $\mu$ g/mL) (**Figure 43A**). En revanche, cette différence de réponse est perdue lorsque la dose de R848 est plus forte (10  $\mu$ g/mL), ce qui suggère un défaut de sensibilité, mais pas un défaut général d'activation, lorsque la stimulation est saturante. On note aussi une diminution de la sensibilité des cDC1 pour la production de TNF- $\alpha$  après une stimulation avec la dose minimale de R848 (1  $\mu$ g/mL) chez les patients HAM/TSP en comparaison des porteurs asymptomatiques (**Figure 43B**). La production de TNF- $\alpha$  par les cellules NK CD56+CD16+ n'est pas modifiée par une stimulation avec du R848, quels que soient la dose utilisée et le groupe analysé (**Figure 43C**). Cependant, la fréquence de cellules NK CD56+CD16+ positifs pour l'expression du TNF- $\alpha$  est plus élevée, pour toutes les conditions, chez les porteurs asymptomatiques en comparaison des donneurs sains (**Figure 43C**), avec notamment une différence statistique pour la dose maximale de R848 (10  $\mu$ g/mL) (**Figure 43C**).



**Figure 43 :** Expression d'IL-12 et de TNF- $\alpha$  par les cellules cDC1 et NK. La fréquence des cellules cDC1 positives pour l'expression de l'IL-12 (A) et du TNF- $\alpha$  (B) et des cellules NK CD56+CD16+ positives pour l'expression de TNF- $\alpha$  (C) est évaluée pour les trois groupes cliniques (HD pour donneur sain, AC pour porteur asymptomatique et HAM/TSP), avec ou sans stimulation au R848 (1x = 1  $\mu$ g/mL et 10x = 10  $\mu$ g/mL). Le test statistique correspond à un test de Kruskal-Wallis (\*P-valeur < 0.05, \*\*\*P-valeur < 0.005).

La production d'IL-2 par les lymphocytes  $T\gamma\delta$  est inducible par une stimulation avec de la PHA ou du PMA/Ionomycine chez les individus sains et porteurs asymptomatiques (**Figure 44A, en vert et orange**). En revanche, cette induction n'est pas observée pour les lymphocytes  $T\gamma\delta$  des patients HAM/TSP (**Figure 44A, en rouge**). De plus, les lymphocytes  $T\gamma\delta$  des patients HAM/TSP produisent des niveaux statistiquement plus élevés d'IL-2 à l'état basal, en comparaison de ceux des donneurs sains (**Figure 44A**). Ainsi, soit l'infection par HTLV-1 inhibe la capacité de ces cellules à produire de l'IL-2 après stimulation, soit l'expression de l'IL-2 est déjà maximale à l'état basal et ne peut être accentuée. L'expression d'IFN- $\gamma$  par les

lymphocytes  $T\gamma\delta$  est induite pour les trois groupes après une stimulation avec de la PHA ou du PMA/Ionomycine (**Figure 44B**), ce qui suggère que l'infection par HTLV-1 ne modifie pas la capacité des lymphocytes  $T\gamma\delta$  à produire de l'IFN- $\gamma$  après stimulation. En revanche, la fréquence de lymphocytes  $T\gamma\delta$  exprimant de l'IFN- $\gamma$  est statistiquement plus élevée chez les patients HAM/TSP par rapport aux donneurs sains, à l'état basal (**Figure 44B**).

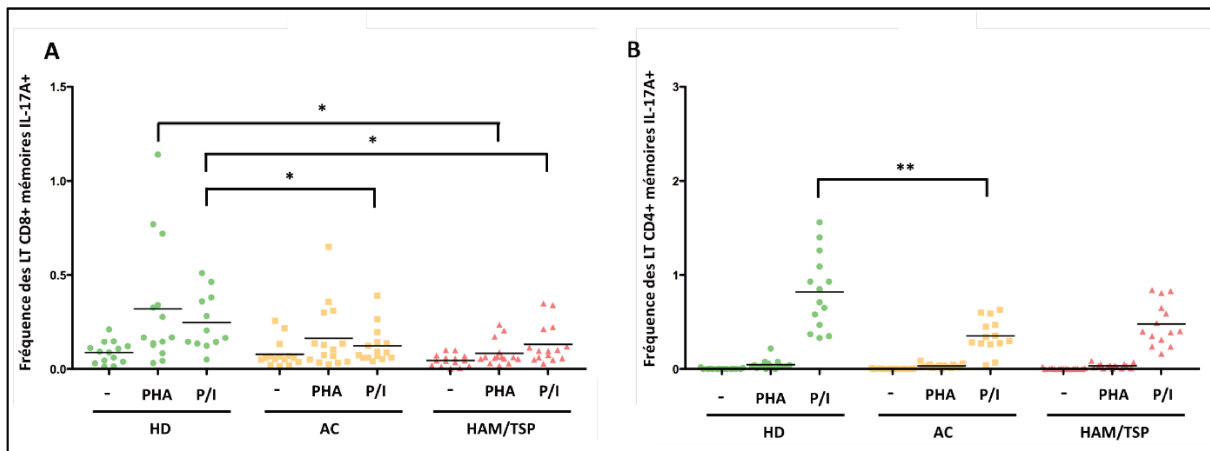


**Figure 44** : Expression d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes  $T\gamma\delta$ . La fréquence des lymphocytes  $T\gamma\delta$  positifs pour l'expression de l'IL-2 (A) et de l'IFN- $\gamma$  (B) à l'état basal ou après stimulation à la PHA ou au PMA/Ionomycine (noté P/I) est évaluée pour les trois groupes cliniques (HD pour donneur sain, AC pour porteur asymptomatique et HAM/TSP). Le test statistique correspond à un test de Kruskal-Wallis (\*P-valeur < 0.05, \*\*P-valeur < 0.01).

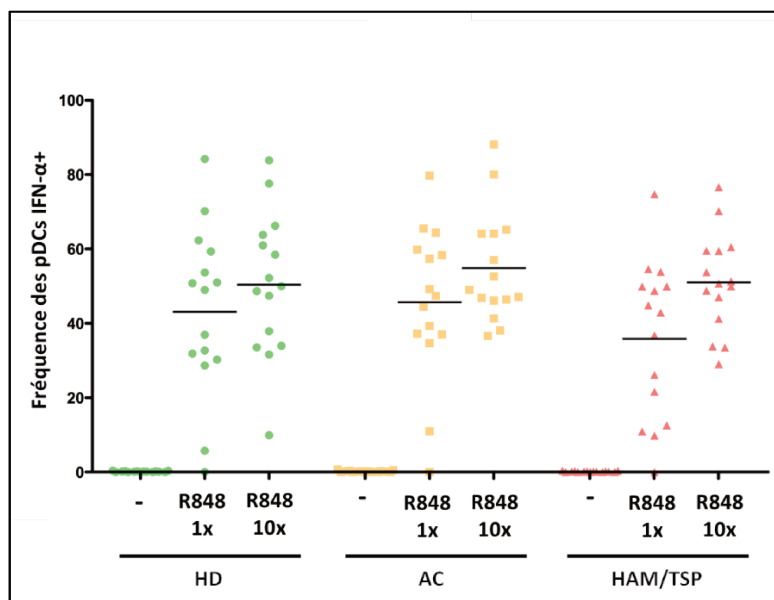
En dehors des lymphocytes  $T\gamma\delta$ , nous avons également observé une diminution de la fréquence des lymphocytes T CD8+ mémoires exprimant l'IL-17A chez les patients HAM/TSP après stimulation à la PHA ou au PMA/Ionomycine et chez les porteurs asymptomatiques après stimulation au PMA/Ionomycine, par rapport aux donneurs sains (**Figure 45A**). Il y a également une fréquence réduite de lymphocytes T CD4+ mémoires exprimant l'IL-17A après stimulation au PMA/Ionomycine chez les porteurs asymptomatiques par rapport aux donneurs sains (**Figure 45B**).

Pour repositionner la place des pDCs dans le développement de l'HAM/TSP, nous avons plus particulièrement étudié la fonctionnalité des pDCs dans notre cohorte. Notre étude n'a montré aucune différence, d'une part dans la fréquence des pDCs (**Figure 42**), et d'autre part dans la

capacité de ces cellules à sécréter de l'IFN- $\alpha$  en absence ou en présence d'une stimulation au R848 (**Figure 46**) entre les trois groupes cliniques (HD, AC et HAM/TSP).



**Figure 45** : Expression d'IL-17A par les lymphocytes T CD4+ et CD8+ mémoires. La fréquence des lymphocytes T CD8+ mémoires (A) et des lymphocytes T CD4+ mémoires (B) positifs pour l'expression de l'IL-17A à l'état basal et après stimulation à la PHA ou au PMA/Ionomycine (noté P/I) est évaluée pour les trois groupes cliniques (HD pour donneur sain, AC pour porteur asymptomatique et HAM/TSP). Le test statistique correspond à un test de Kruskal-Wallis (\*P-valeur < 0.05, \*\*P-valeur < 0.01).



**Figure 46** : Expression de l'IFN- $\alpha$  par les pDCs. La fréquence des pDCs positives pour l'expression de l'IFN- $\alpha$  à l'état basal ou après stimulation au R848 (1x = 1  $\mu$ g/mL et 10x = 10  $\mu$ g/mL) est évaluée pour les trois groupes cliniques (HD pour donneur sain, AC pour porteur asymptomatique et HAM/TSP).

		LT $\gamma\delta$			LT CD8+ naïfs			LT CD8+ mémoires					LT CD4+ naïfs			LT CD4+ mémoires				
		IFN- $\gamma$ +	IL-2+	TNF- $\alpha$ +	IFN- $\gamma$ +	IL-2+	TNF- $\alpha$ +	IFN- $\gamma$ +	IL-2+	TNF- $\alpha$ +	IL-17A	IL-21	IFN- $\gamma$ +	IL-2+	TNF- $\alpha$ +	IFN- $\gamma$ +	IL-2+	TNF- $\alpha$ +	IL-17A	IL-21
Non stimulé	HD	1,062	1,934	4,258	0,403	0,148	0,566	1,428	0,879	1,225	0,323	2,959	0,290	0,133	0,385	0,326	0,366	1,069	0,003	1,649
	AC	1,303	2,977	5,398	0,431	0,201	0,890	0,437	0,581	1,573	0,458	1,208	0,257	0,180	0,587	0,303	0,366	1,835	0,003	0,963
	HAM/TSP	2,305	6,612	8,813	0,643	0,277	0,920	0,342	0,743	0,728	0,046	1,527	0,256	0,163	0,388	0,270	0,378	1,039	0,004	1,268
PHA	HD	15,623	3,385	21,186	23,981	1,042	21,738	19,351	4,493	15,498	0,792	4,945	3,865	1,422	6,812	6,434	3,940	12,263	0,047	2,357
	AC	17,234	5,130	29,446	25,853	0,867	23,025	30,347	3,582	24,311	0,163	2,600	4,765	1,181	7,763	7,134	2,995	12,757	0,032	1,681
	HAM/TSP	14,145	6,633	26,764	29,965	0,775	20,614	26,115	3,367	14,797	0,084	2,509	5,124	1,338	7,166	6,424	2,940	10,163	0,033	1,738
PMA/Ionomycine	HD	53,718	5,431	25,011	48,777	8,093	22,959	52,755	26,527	26,974	0,813	5,360	14,753	34,518	17,695	29,633	57,220	50,476	0,820	12,359
	AC	47,247	4,421	30,281	51,324	5,887	27,521	61,497	18,861	33,143	0,124	5,011	12,525	27,529	19,609	23,725	47,349	46,538	0,455	9,888
	HAM/TSP	47,327	7,009	29,124	61,961	8,798	32,375	64,105	23,613	32,235	0,132	7,123	17,128	32,865	21,271	24,059	51,713	48,277	0,558	15,441

		cDC1		cDC2			pDC		NK CD56+CD16+		NK CD56+CD16-	
		IL-12+	TNF- $\alpha$ +	IL-12+	TNF- $\alpha$ +	MIP-1 $\alpha$ +	IFN- $\alpha$ +	TNF- $\alpha$ +	IFN- $\gamma$ +	TNF- $\alpha$ +	IFN- $\gamma$ +	TNF- $\alpha$ +
Non stimulé	HD	12,66	6,00	8,57	10,68	0,73	0,14	7,55	0,08	3,41	0,62	3,82
	AC	5,30	6,07	8,14	12,72	1,13	0,17	8,74	0,08	10,02	0,71	7,08
	HAM/TSP	24,00	7,72	15,06	12,02	1,01	0,15	9,27	0,21	4,49	1,13	5,64
R848 1 $\mu\text{g/mL}$	HD	39,97	30,36	83,03	80,22	6,10	43,11	65,67	2,98	4,30	17,53	7,20
	AC	25,41	32,28	76,13	76,36	9,78	45,69	69,40	3,88	7,50	12,43	7,38
	HAM/TSP	32,79	21,30	73,05	68,90	5,29	35,83	64,44	3,15	4,46	14,75	6,73
R848 10 $\mu\text{g/mL}$	HD	86,40	71,88	96,66	95,84	10,29	50,41	66,52	4,27	3,45	19,29	6,33
	AC	88,98	82,34	95,43	95,81	10,51	54,86	69,50	4,32	7,07	15,13	6,77
	HAM/TSP	91,59	77,34	97,08	97,02	13,33	51,03	68,13	5,07	4,92	21,01	8,02

**Tableau 3 :** Sécrétions cytokiniques par les cellules immunitaires à l'état basal ou après stimulation. Les valeurs indiquées correspondent à la fréquence moyenne du nombre de cellules qui sécrètent une cytokine donnée (entrée verticale), en fonction des stimulations et du groupe clinique (entrée horizontale). Les cases bleues (\*), vertes (\*\*) et oranges (\*\*\*) correspondent à des différences statistiques pour une stimulation, une population immunitaire et une cytokine donnée, entre les trois groupes cliniques (HD pour donneur sain, AC pour porteur asymptomatique et HAM/TSP). Le test statistique correspond à un test de Kruskal-Wallis (\*P-valeur < 0.05, \*\*P-valeur < 0.01, \*\*\*P-valeur < 0.005).

## 2.4. Conclusion

A partir des échantillons d'individus sains, porteurs asymptomatiques et HAM/TSP, nous avons dans un premier temps observé une élévation de la charge provirale chez les patients HAM/TSP par rapport aux porteurs asymptomatiques ainsi qu'une fréquence plus élevée de lymphocytes T CD4+ mémoires et T CD8+ mémoires chez les patients HAM/TSP par rapport aux donneurs sains, résultats conformes aux études antérieures et qui valident notre cohorte. En revanche, les altérations de la réponse immunitaire sont marginales et semblent surtout cibler des populations rares, telles que les cellules myéloïdes cDC1 ou les lymphocytes T $\gamma\delta$ , pour lesquelles des altérations de la production cytokinique sont visibles chez les patients. Aucune différence n'a été observée dans la fréquence ou la sensibilité des pDCs à induire une production d'IFN- $\alpha$  après une stimulation au R848 entre les trois groupes d'individus. Les perspectives directes de cette étude sont de poursuivre l'analyse des données de cytométrie, en vérifiant s'il y a des différences dans le pourcentage de ces cellules à sécréter plusieurs cytokines en même temps, ou bien des différences, non pas dans le pourcentage de cellules positives pour l'expression d'une cytokine, mais dans l'intensité de fluorescence moyenne, ce qui serait associé à des variations dans leurs niveaux d'expression. Enfin, nous envisageons de déterminer si des corrélations existent entre les différents paramètres analysables (fréquence, production de cytokine à l'état basal ou après stimulation, charge provirale, âge, sexe).

# **DISCUSSION**



## 1. Activation des pDCs par les cellules infectées par HTLV-1

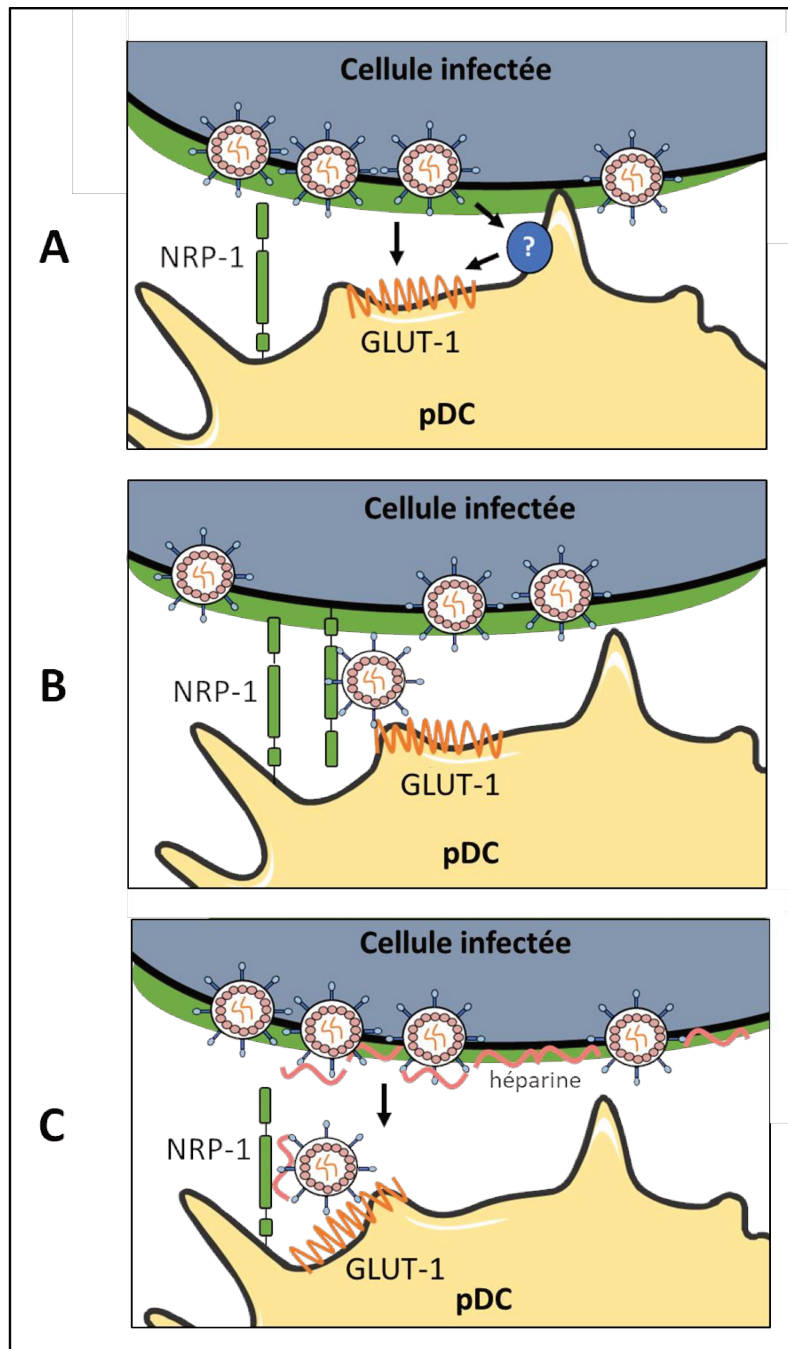
Nos résultats mettent en avant que l'activation efficace de la pDC par HTLV-1 requiert un contact cellule-cellule, ce qui a également été observé pour d'autres virus ([Pour revue : Assil et al., 2015](#)). En effet, en présence d'une membrane semi-perméable, le virus libre produit au moment de la coculture ne suffit pas à induire la production d'IFN-I par la pDC. Nous ne remettons pas ici en question les travaux précédents qui ont montré que les particules virales libres de HTLV-1 sont capables d'induire une production d'IFN- $\alpha$  ([Colisson et al., 2010](#)). En effet, il faut noter que dans cette étude, l'élément viral correspond à des particules virales qui ont été purifiées à partir d'une culture sur la nuit de cellules infectées par HTLV-1 (MT-2), ce qui permet notamment d'avoir, au moment de la coculture avec des pDCs, une concentration élevée de particules virales, au contraire de notre système expérimental qui nécessite la production de novo de particules virales à partir des cellules infectées. De plus, la production d'IFN- $\alpha$  induite par le surnageant de culture des cellules MT-2, et mesurée à l'aide d'un test ELISA, est d'environ 1 000 pg/mL lors d'une culture avec 100 000 pDCs ([Colisson et al., 2010](#)), ce qui correspond à une valeur d'environ 5 000 U/mL après conversion. Cette valeur reste cependant entre 10 et 100 fois inférieure au niveau d'IFN-I produit après coculture de cellules MT-2 avec 100 000 pDCs au ratio 1:1 entre nos mains, confirmant ainsi l'importance de l'établissement d'un contact cellule-cellule pour induire une réponse IFN-I élevée et probablement efficace pour la mise en place d'une réponse immunitaire adéquate. De plus, il a été suggéré que l'activation de la pDC par une cellule infectée favoriserait la mise en place d'une réponse IFN-I localisée aux sites d'infection, ce qui éviterait notamment une réponse inflammatoire systémique ([Pour revue : Webster et al., 2016](#)). L'activation des pDCs par le biais d'un contact cellulaire s'intègre efficacement dans le modèle de l'infection par HTLV-1, principalement véhiculé par un contact cellulaire ([Pour revue : Pique and Jones, 2012](#) ; [Pour revue : Gross and Thoma-Kress, 2016](#)). De plus, il est plus probable que ce soient les cellules infectées par HTLV-1, plutôt que le virus libre, qui activent les pDCs in vivo, puisque très peu de particules virales sont détectées dans le sang des individus infectés ([Demontis et al., 2015](#)).

Nous avons mis en évidence que le biofilm viral, une structure récemment décrite comme contribuant à la transmission du virus HTLV-1 entre une cellule infectée et une cellule non infectée ([Pais-Correia et al., 2010](#) ; [Alais et al., 2015](#)), était capable d'induire la production d'IFN-I, puisque l'exposition des pDCs à cette structure est suffisante pour déclencher leur activation. De plus, la déplétion enzymatique de cette structure à la surface de la membrane

plasmique de la cellule infectée renforce son importance dans l'activation des pDCs. L'ajout d'héparine au moment de la coculture potentialise l'induction de la réponse IFN-I à la fois par le biofilm viral isolé et par les cellules C91-PL. Cette observation est couplée avec une augmentation du nombre de conjugués « cellule infectée – pDC ». Nous ne pouvons pas mesurer les conjugués « biofilm viral-pDCs », mais il est également possible que l'héparine favorise l'adhésion du biofilm viral sur les pDCs. Pour autant, l'héparine n'affecte ni la capacité infectieuse des cellules infectées par HTLV-1, ni celle du biofilm viral. Cette observation est étonnante puisque l'héparine est capable d'inhiber le potentiel infectieux de plusieurs virus (Cerqueira et al., 2013 ; Rider et al., 1994 ; Walker et al., 2002 ; Lin et al., 2002). En effet, l'héparine est capable de se fixer sur les glycoprotéines virales, limitant ainsi l'interaction de ces dernières avec leurs récepteurs, mais aussi l'attachement des virus aux héparanes sulfates présents à la membrane plasmique (Pour revue : Germe et al., 2001). Les HSPGs étant impliquées dans l'attachement des particules virales de HTLV-1 à la surface des lymphocytes, nous nous attendions à observer une diminution de l'infection en présence d'héparine, d'autant que l'inhibition de la fixation de particules virales de HTLV-1 sur des lymphocytes en présence d'héparine soluble a déjà été observée (Jones et al., 2005). Au contraire, une autre étude a mis en évidence que l'héparine était capable d'interagir avec NRP-1 (Vander Kooi et al., 2007). Cette interaction pourrait notamment contribuer à l'amélioration de la réponse IFN-I de la pDC stimulée avec des cellules infectées ou du biofilm viral en présence d'héparine, puisque l'héparine serait potentiellement capable de ponter les glycoprotéines de la matrice extracellulaire présentes à la surface des cellules infectées ou contenues dans le biofilm viral avec NRP-1 (également connu sous le nom de BDCA-4), ce dernier étant exprimé de manière importante et constitutive à la surface des pDCs (Dzionic et al., 2001) (**Figure 2A de l'article**).

Le mécanisme d'entrée du virus HTLV-1 dans la pDC reste cependant intrigant, puisque la production d'IFN-I par la pDC est atténuée après la compétition des récepteurs GLUT-1 et NRP-1 avec du RBD, mais que l'utilisation du VEGF (qui cible spécifiquement NRP-1) est sans effet. Ceci suggère que NRP-1 n'est pas requis dans le processus d'entrée virale lors d'un contact cellulaire. Si une étude a montré que NRP-1 est impliqué dans la transmission de HTLV-1 depuis une pDC vers un lymphocyte T (Jones et al., 2008), notre système expérimental est cependant inversé, avec une transmission virale d'un lymphocyte T vers la pDC, ce qui relève la possibilité de mécanismes ou de l'utilisation de récepteurs différentiels. De plus, l'importance des protéines NRP-1 et GLUT-1 dans l'entrée de HTLV-1 semble dépendante de la nature de la cellule cible. En effet, une étude a mis en évidence que la compétition de

NRP-1 avec du VEGF n'inhibe pas l'entrée de particules virales pseudotypées avec la protéine d'enveloppe de HTLV-1 dans des cellules HeLa, tandis que l'utilisation d'un anticorps dirigé contre GLUT-1 inhibe cette entrée (Jin et al., 2010). Au contraire, pour une lignée de glioblastomes humains, les cellules U87, la même étude observe que GLUT-1 n'est pas essentiel, au contraire de NRP-1, dans l'entrée de ces mêmes particules virales (Jin et al., 2010). Ceci suggère une utilisation différentielle de NRP-1 pour l'entrée virale en fonction des populations cellulaires. Ceci nous conduit à notre première hypothèse pour expliquer l'absence d'effet de VEGF, à savoir que NRP-1 n'est pas important pour l'entrée du virus dans la pDC, soit parce qu'un ou plusieurs autres récepteurs sont importants pour l'entrée de HTLV-1 dans la pDC, soit parce que le contact cellule-cellule suffit à contourner la nécessité de fixation de la particule de HTLV-1 aux HSPGs et NRP-1, en favorisant directement le rapprochement entre HTLV-1 et GLUT-1 (**Figure 47A**). Il y a notamment une présence concomitante de NRP-1 et de GLUT-1 au site de contact entre une cellule infectée par HTLV-1 et une cellule non infectée (Ghez et al., 2006). Si GLUT-1 est principalement exprimé à la surface des cellules cibles, NRP-1 est exprimée à la surface des deux cellules (Ghez et al., 2006). Au vu des capacités des protéines d'enveloppe à interagir avec NRP-1, il est aussi possible que l'entrée virale fasse intervenir les molécules NRP-1, non pas à la surface de la cellule cible, mais à la surface de la cellule infectée (**Figure 47B**). Dans ce modèle, l'addition de VEGF n'aurait pas d'effet car HTLV-1 serait déjà complexé à NRP-1 à la surface de la cellule infectée. Enfin, comme discuté précédemment, l'héparine est capable d'interagir avec NRP-1 (Vander Kooi et al., 2007). Cette interaction se fait notamment au niveau du domaine b de NRP-1 et n'empêche pas l'interaction de VEGF avec NRP-1, qui au contraire est même potentialisée en présence d'héparine (Vander Kooi et al., 2007). L'héparine physiologiquement présente dans la matrice extracellulaire des cellules infectées et à la surface des glycoprotéines virales pourrait favoriser l'interaction indirecte des particules virales de HTLV-1 à NRP-1, qui ne serait pas inhibé en présence de VEGF (**Figure 47C**). Les trois modèles proposés ci-dessus ne sont pas mutuellement exclusifs et pourraient représenter la transmission du virus HTLV-1 lors d'un contact cellule-cellule pour d'autres cellules cibles que la pDC. Pour mettre en évidence avec certitude la pertinence de NRP-1 dans l'entrée du virus HTLV-1 dans les pDCs, il serait intéressant de réduire son expression dans la pDCs (siARN, CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)) ou de bloquer son interaction potentielle à l'héparine.

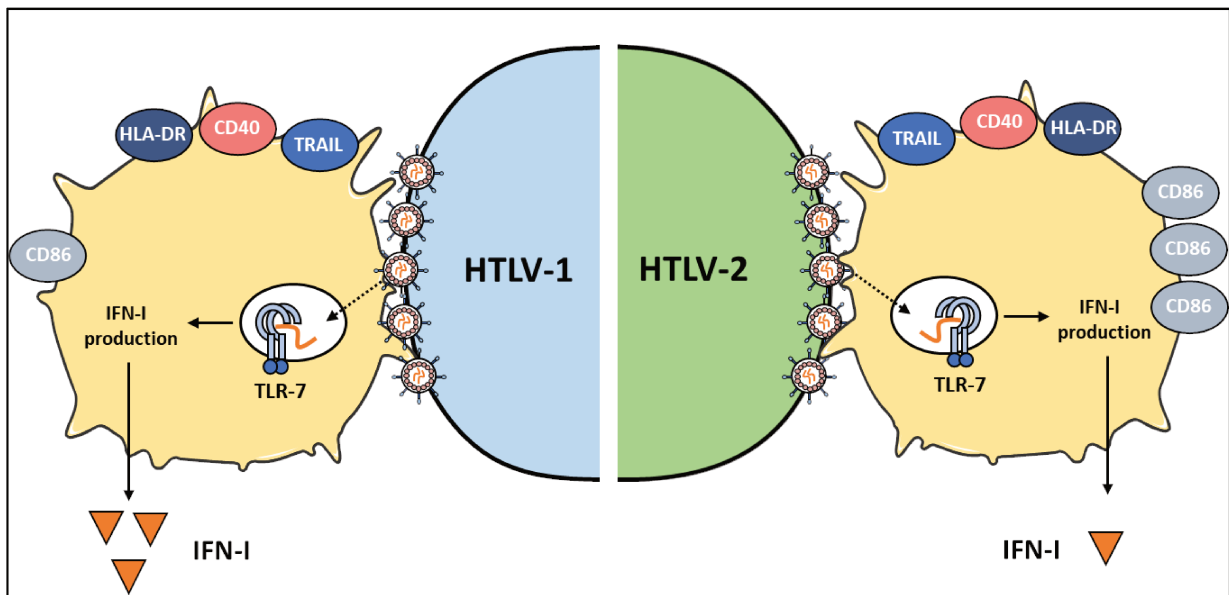


**Figure 47 :** Modèles hypothétiques de l'implication de NRP-1 pour l'entrée du virus dans la pDC. A) NRP-1 n'est pas essentiel à l'entrée du virus dans la pDC après transmission par un contact cellulaire. Le contact cellulaire peut faciliter l'interaction du virus en surface directement avec GLUT-1. Un ou plusieurs récepteurs autres que NRP-1, et non identifiés, peuvent également intervenir dans l'entrée du virus HTLV-1 dans la pDC. B) Le virus à la surface de la cellule infectée peut s'associer aux molécules NRP-1 qui sont exprimées par la cellule infectée, ce qui permet son rapprochement avec GLUT-1 au niveau du site de contact cellule-cellule. C) L'héparine présente à la surface de la cellule infectée, au sein de la matrice extracellulaire, et qui s'associe aux glycoprotéines virales de HTLV-1 peut directement s'associer aux molécules NRP-1 à la surface de la pDC, permettant le rapprochement du virus avec GLUT-1.

## 2. Vers une différence entre HTLV-1 et HTLV-2 dans l'activation des pDCs ?

Notre étude s'est focalisée sur l'utilisation de 5 lignées chroniquement infectées par HTLV-1 et HTLV-2 (C91-PL, Hut102, MT-2 pour HTLV-1 et C19, MO pour HTLV-2) pour déterminer si des divergences existaient entre la capacité des virus à induire la production d'IFN-I par les pDCs. Si toutes les cellules sont capables d'induire cette production, la lignée C19 induit une moindre production d'IFN-I par rapport aux autres cellules, et ce même lorsque des ratios de cellules plus élevés sont utilisés. La lignée C19 n'est pourtant pas déficiente dans la production d'ARN viral, par rapport à la lignée C91-PL et l'ARN viral produit par la lignée C19 est aussi reconnu par la pDC pour induire une réponse IFN-I, à travers la signalisation dépendante de TLR-7. De plus, les cellules C19, qui forment un nombre de conjugués avec les pDCs similaire à ce qui est obtenu avec les cellules C91-PL, sont également capables d'infecter des lymphocytes T, et utilisent les mêmes récepteurs pour l'entrée virale au niveau de la pDC. La lignée C19 est capable d'induire une activation des pDCs au même titre que les autres lignées, via l'expression à la surface de celles-ci des protéines TRAIL, CD40, CD86 ou HLA-DR, ce qui suggère que l'inhibition de la production d'IFN-I n'est pas liée à un défaut d'activation global de la pDC. Il est également intéressant de noter que l'expression de CD86 paraît plus importante après la stimulation des pDCs par les cellules infectées par HTLV-2 (C19 et MO) par rapport à ce qui est observé après leur stimulation par les cellules infectées par HTLV-1 (C91-PL, Hut102, MT-2), indépendamment de la lignée. Ceci n'est pas sans rappeler une observation similaire dans une étude qui comparait les virus HIV-1 et HIV-2 pour leur capacité à stimuler les pDCs (Royle et al., 2014). Après reconnaissance de HIV-1, les pDCs développent majoritairement un phénotype IFN- $\alpha$ + CD86-, tandis qu'après reconnaissance de HIV-2, les pDCs développent majoritairement un phénotype IFN- $\alpha$ - CD86+. Si les deux virus sont pathogènes, la progression vers le stade SIDA est plus lente suite une infection par HIV-2. Il a ainsi été suggéré par cette étude que l'induction différentielle des pDCs par HIV-1 ou HIV-2 pouvait contribuer au modelage du phénotype immunitaire au cours de l'infection. De plus, pour des concentrations de virus comparables, l'infection de PBMCs par HIV-1 induit une production d'IFN- $\alpha$  plus importante et plus précoce, par rapport à HIV-2, tandis que la production d'autres cytokines, telles que l'IL-8, le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  reste inchangée (Royle et al., 2014), ce qui démontre que le virus HIV-2 est néanmoins capable d'induire une réponse cytokinique. Il serait intéressant de vérifier si la production de cytokines autres que l'IFN-I, telles que le TNF- $\alpha$  ou l'IL-6, est similaire ou différente entre les différentes lignées infectées par HTLV-1 et HTLV-2, après coculture avec les pDCs. Puisque les deux lignées infectées par

HTLV-2 (C19 et MO) sont celles qui induisent le plus l'expression de CD86 à la surface des pDCs (**Figure 35C**) et sont celles qui induisent le moins la production d'IFN-I par les pDCs, en comparaison des trois lignées infectées par HTLV-1 (**Figure 5A de l'article**), nous proposons qu'HTLV-2 induit préférentiellement la maturation des pDCs au contraire de HTLV-1, qui induit préférentiellement la production d'IFN-I par ces cellules (**Figure 48**), suggérant ainsi la possibilité d'une fonctionnalité différente des pDCs in vivo dans le contrôle de l'infection par HTLV-1 ou -2.

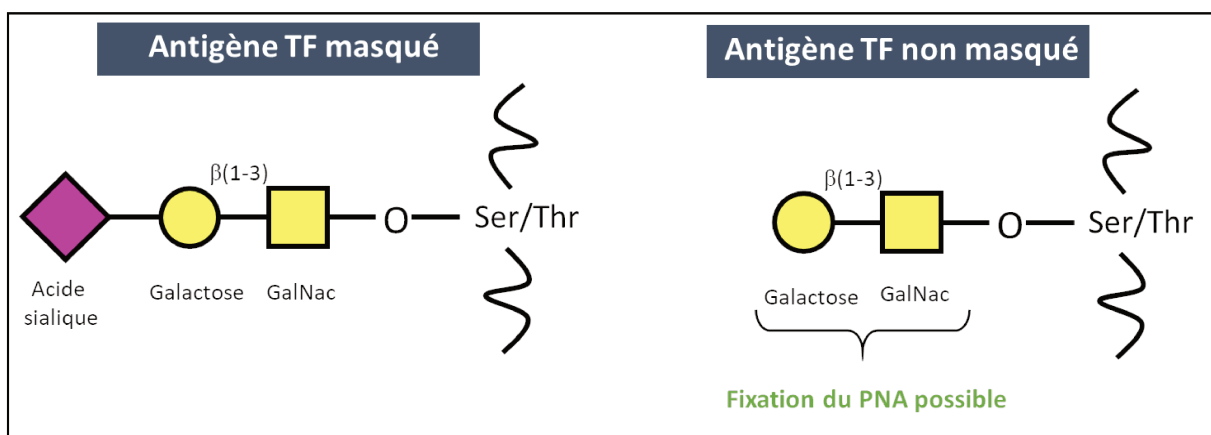


**Figure 48** : Activation différentielle des pDCs par les cellules infectées par HTLV-1 et HTLV-2. Les deux virus induisent la production d'IFN-I après activation de la signalisation TLR-7 et l'expression de plusieurs protéines à la surface des pDCs. L'expression de TRAIL, CD40 et HLA-DR est induite à des niveaux similaires par les deux virus. Si HTLV-1 induit principalement la production d'IFN-I, HTLV-2 induit principalement la maturation des pDCs, via une expression accrue de CD86 en surface.

### 3. L'antigène TF au cœur de la régulation de la réponse IFN-I ?

Nous avons corrélé la capacité des cellules infectées par HTLV-1 et HTLV-2 à induire une réponse IFN-I par la pDC avec l'expression de l'antigène TF à la surface de la cellule infectée. L'antigène TF correspond à une structure glycosylée de type Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc, une des modifications les plus couramment retrouvées dans les carcinomes. En effet, les cellules cancéreuses sont très souvent caractérisées par des protéines membranaires avec des motifs de glycosylation aberrants (*Pour revue : Christiansen et al., 2014*). Ces modifications du glycome peuvent faciliter l'agrégation des cellules cancéreuses entre elles mais également favoriser la

progression tumorale voire l'avancée en métastase. L'antigène TF peut notamment interagir avec d'autres protéines, comme des galectines, ce qui favorise le développement tumoral (Pour revue : Sindrewicz et al., 2016). Dans les structures normales, l'antigène TF est masqué par d'autres résidus glycosylés formant des structures complexes ou peut être modifié par sialylation, sulfatation ou fucosylation (Pour revue : Sindrewicz et al., 2016). En absence de ces structures secondaires, le disaccharide Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc peut fixer la lectine PNA. C'est fréquemment une expression altérée des glycosyltransférases, comme les sialyltransférases par exemple, qui conduit à la présence de l'antigène TF non masqué à la surface de la cellule (Pour revue : Sindrewicz et al., 2016) (Figure 49).



**Figure 49** : Conformations masquée et non masquée de l'antigène TF. L'antigène TF est généralement recouvert par des dérivés glycosylés, comme de l'acide sialique, à la surface des cellules. La déplétion de cet acide sialique expose l'antigène TF à la surface des cellules et la fixation de la lectine PNA sur cet antigène TF devient possible.

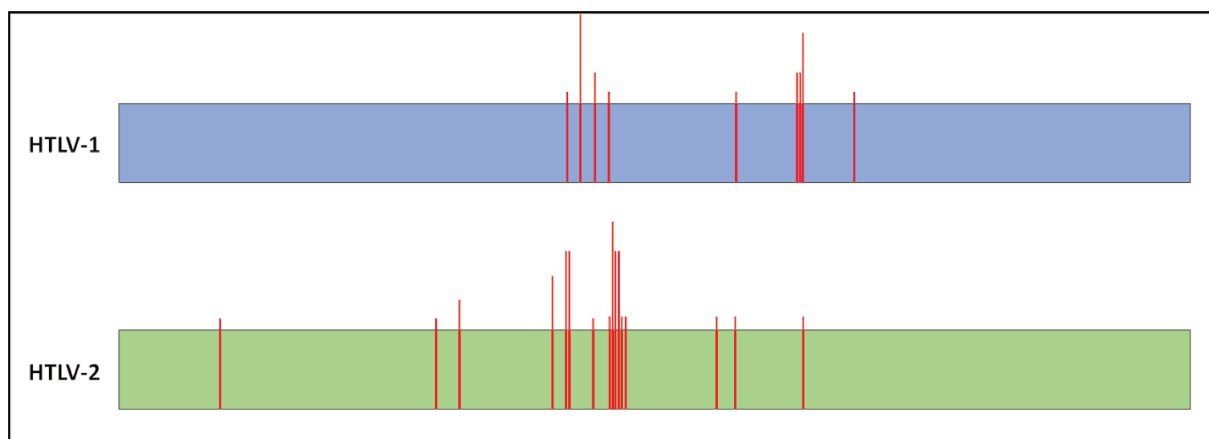
Nous avons précédemment observé que la saturation de l'antigène TF à la surface des cellules C19 augmentait la production d'IFN-I, tandis que son exposition à la surface des cellules C91-PL favorisait l'inhibition de la production d'IFN-I. Nous envisageons à présent d'éliminer ce motif glycosylé des cellules C19 par un clivage enzymatique à l'aide d'une O-glycosidase pour valider nos résultats. En effet, le traitement à la neuraminidase, qui améliore l'exposition de l'antigène TF via le clivage des acides sialiques, est peu spécifique et altère probablement la composition globale du glycome, ce qui peut être à l'origine d'effets indésirables, comme une diminution de l'adhésion de la cellule infectée à la pDC, ce que nous n'avons pas vérifié. En parallèle, il est également nécessaire de vérifier que l'augmentation de la réponse IFN-I après saturation de l'antigène TF par un traitement avec la lectine PNA ne modifie pas le nombre de

conjugués entre les cellules C19 et les pDCs. Si le traitement des cellules C91-PL à la neuraminidase réduit leur capacité à induire une réponse IFN-I, nous avons cependant observé que ce même traitement ne réduit pas la capacité infectieuse de ces cellules, et au contraire, tend même à l'augmenter (résultat non montré). Une étude précédente avait déjà mis en évidence que le traitement à la neuraminidase de particules virales libres de HTLV-1 ou de cellules C91-PL améliore leur capacité infectieuse (Tanaka et al., 2010), ce qui conforte nos observations et exclut une baisse de la reconnaissance du virus par ces récepteurs après un traitement avec de la neuraminidase.

La surface de colocalisation entre les carbohydrates et les protéines virales à la surface des cellules infectées par HTLV-1 étant relativement faible (Pais-Correia et al., 2010), il a été précédemment suggéré que les lectines se fixent principalement sur les glycoprotéines de la cellule infectée plutôt que sur les protéines d'enveloppe virale (Pais-Correia et al., 2010). Ainsi, il est probable que l'antigène TF ne soit pas exprimé par les protéines d'enveloppe mais par la cellule C19 elle-même. Si des sites de glycosylations putatifs sont néanmoins présents dans les séquences en acides aminés des protéines d'enveloppes de HTLV-1 et HTLV-2, lesquels ont été évalués par l'analyse de leurs séquences en acides aminées (entrées UniProt P23064 et P03383) avec le logiciel NetOGlyc (v4.0.0.12) (Figure 50), aucune étude n'a démontré expérimentalement si ces protéines d'enveloppe étaient O-glycosylées. Une étude a suggéré qu'une élévation de l'O-glycosylation à la surface des lymphocytes infectés par HTLV-1 pourrait favoriser la concentration des particules virales en surface et améliorer la transmission virale (Mazurov et al., 2012). D'autres études ont montré que la protéine Tax de HTLV-1 était capable d'altérer les processus de glycosylation dans les cellules infectées, puisque Tax est notamment capable d'induire l'expression de fucosyltransférases (Hiraiwa et al., 2003), responsable de l'expression du motif de glycosylation Sialyl Lewis X à la surface des cellules infectées chez les patients HAM/TSP et ATLL (Kambara et al., 2002 ; Hiraiwa et al., 1997), ou de favoriser le processus d'O-N-acétylglucosaminylation, c'est-à-dire l'ajout de résidus O-GlcNAc sur les protéines cytoplasmiques ou nucléaires (Groussaud et al., 2017). Une question qui reste donc en suspens est de savoir si l'expression de l'antigène TF peut être viro-induite ou si elle résulte simplement d'évènements aléatoires de transformation des cellules infectées. Nous avons observé que la capacité infectieuse des lignées infectées par HTLV-1 et HTLV-2 est positivement corrélée avec l'expression de l'antigène TF. De manière intéressante, la capacité infectieuse d'autres virus, tels que HIV-1 et Influenza corrèle aussi positivement avec l'expression des GalNAc-transférases (Nakamura et al., 2016 ; Termini et al., 2017), ce



qui suggère une potentielle intervention de l'O-glycosylation dans l'infectiosité de certains virus. Des expériences supplémentaires sont requises pour déterminer si les virus HTLV-1 et HTLV-2 sont également capables de réguler le mécanisme d'O-glycosylation, si les glycoprotéines virales sont O-glycosylées, et si oui, quel est l'impact de cette glycosylation sur l'infectivité de ces virus.



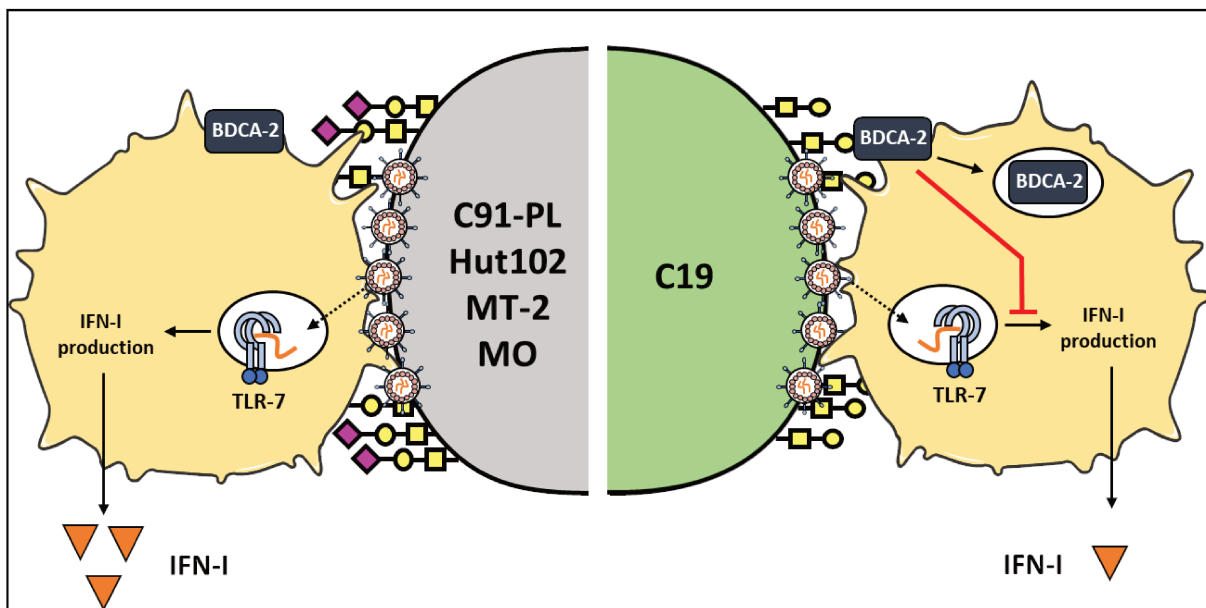
**Figure 50** : Représentation schématique des sites putatifs d'O-glycosylation sur les glycoprotéines d'enveloppe de HTLV-1 et HTLV-2. Chaque trait rouge vertical correspond à la position d'un acide aminé dont l'O-glycosylation a été évaluée comme potentiellement positive. La hauteur relative des traits correspond à la probabilité de l'acide aminé à être O-glycosylé, un grand trait étant associé à une probabilité plus élevée. Le schéma est une retranscription manuelle des résultats obtenus avec le logiciel NetOGlyc, à l'aide des entrées UniProt P23064 et P03383.

Pour comprendre comment l'exposition de l'antigène TF pourrait réguler la production d'IFN-I par les pDCs, nous nous sommes demandé si cet antigène TF pouvait activer des récepteurs régulateurs à la surface des pDCs. En effet, les CLR<sub>s</sub> BDCA-2 et DCIR sont notamment capables de fixer des glycoprotéines virales (Florentin et al., 2012 ; Martinelli et al., 2007 ; Bloem et al., 2014), ce qui entraîne une inhibition de la production d'IFN-I par la pDC (Florentin et al., 2012 ; Martinelli et al., 2007). Deux études ont déterminé les motifs glycosylés qui étaient les plus affins pour l'interaction avec DCIR ou BDCA-2 et ont observé que la fixation de l'antigène TF, soit sur le CRD de BDCA-2, soit sur la protéine de fusion Fc-DCIR, est relativement faible en comparaison d'autres motifs de glycosylations (Bloem et al., 2013 ; Jégouzo et al., 2015). Ces résultats ont cependant été obtenus en étudiant l'interaction de ces CLR<sub>s</sub> avec différents groupements glycosylés dans un système acellulaire. Puisque des différences existent dans le processus de fixation de groupements glycosylés sur DCIR, qu'il soit exprimé sous forme libre ou à la surface d'une cellule (Bloem et al., 2013), il est donc

possible que l'affinité de l'antigène TF pour ces deux récepteurs soit différente dans un modèle cellulaire, dans lequel l'antigène TF est complexé à une protéine et les récepteurs régulateurs sont exprimés à la surface cellulaire. Nous avons émis l'hypothèse que l'antigène TF, abondamment exprimé à la surface des cellules C19, serait capable d'interagir avec l'un de ces deux récepteurs à la surface des pDCs (**Figure 51**). En support de cette hypothèse, nous avons notamment observé que la fréquence des pDCs exprimant BDCA-2 à leur surface était réduite lorsque celles-ci avaient été cocultivées avec la lignée infectée C19, en comparaison de pDCs cocultivées avec les autres lignées infectées par HTLV-1 et HTLV-2, ce qui pourrait ainsi signifier une internalisation du récepteur, phénomène également observé lorsque celui-ci est activé (Pellerin et al., 2015). Pour confirmer ce résultat et notre hypothèse, nous envisageons à présent de vérifier que le niveau d'expression de BDCA-2, après perméabilisation des pDCs, reste constant quel que soit la lignée infectée inductrice de la réponse IFN-I, pour valider l'internalisation de BDCA-2. Nous envisageons également de bloquer l'accessibilité à BDCA-2 à l'aide de fragments Fab d'un anticorps monoclonal dirigé contre ce dernier, qui a la particularité de ne pas activer le récepteur, au contraire d'un anticorps complet (Pellerin et al., 2015 ; Florentin et al., 2012 ; Martinelli et al., 2007), mais également de vérifier l'activation de BDCA-2 en mesurant la phosphorylation des intermédiaires de la signalisation sous-jacente (Florentin et al., 2012).

Savoir si les cellules infectées expriment l'antigène TF *in vivo* reste une question ouverte, que ce soit chez les patients ATLL ou HAM/TSP. À l'heure actuelle, une seule étude a observé une expression de cet antigène TF à la surface des cellules infectées d'un patient HAM/TSP (Pais-Correia et al., 2010). Des investigations supplémentaires sont donc nécessaires pour déterminer à la fois la fréquence de l'expression de cet antigène à la surface des cellules infectées et si son expression est couplée à une symptomatologie particulière. Si l'expression de l'antigène TF non masqué, détectable grâce à l'utilisation d'un anticorps ou de la PNA (**Figure 49**), a été observée dans près de 90 % des cas de carcinomes (Pour revue : Sindrewicz et al., 2016), une étude a mis en évidence que peu de lignées cellulaires établies à partir de leucémies expriment l'antigène TF non masqué, l'expression étant restreinte à une fraction de cellules au sein même d'une lignée cellulaire (Cao et al., 2008). En revanche, un traitement à la neuraminidase permet le marquage de l'ensemble des lignées cellulaires testées dans cette même étude (Cao et al., 2008), ce qui montre que l'ensemble des cellules leucémiques de cette étude sont capables d'exprimer l'antigène TF, mais que celui-ci est habituellement masqué par de l'acide sialique. Puisque nos résultats mettent en évidence que l'exposition de l'antigène TF désialylé à la

surface des cellules infectées réduit la production d'IFN-I par les pDCs, on peut également émettre l'hypothèse que l'expression de cet antigène dans le contexte des carcinomes pourrait contribuer à l'inhibition de la production d'IFN-I par les pDCs infiltrées dans la tumeur, en parallèle de l'expression de TGF- $\beta$  et d'IL-10 par les cellules cancéreuses (Sisirak et al., 2013) (Labidi-Galy et al., 2011), l'ensemble contribuant ainsi au développement d'un micro-environnement pro-tumoral. Un phénomène similaire pourrait être envisagé au sein des lymphomes ou des organes lymphoïdes secondaires chez les patients ATLL, si les cellules leucémiques issues de ces patients sont également capables d'exprimer l'antigène TF.



**Figure 51** : Modèle d'inhibition de la production d'IFN-I par la pDC après reconnaissance des cellules C19. La forte expression de l'antigène TF désialylé (Figure 49) à la surface des cellules C19 pourrait activer BDCA-2, ce qui par conséquent induirait son internalisation et inhiberait la production d'IFN-I par la pDC, au contraire des autres lignées testées (C91-PL, Hut102, MT-2, MO).

#### 4. Vers la découverte de nouveaux biomarqueurs de l'HAM/TSP ?

Dans notre étude, nous avons observé que les patients HAM/TSP présentaient une fréquence plus élevée de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> mémoires par rapport aux donneurs sains ou aux porteurs asymptomatiques. Une étude antérieure ayant observé qu'il y avait une corrélation entre le nombre absolu de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> mémoires circulants et la charge provirale chez les individus infectés (Yasunaga Ji et al., 2001), notre résultat semble donc pertinent puisque la charge provirale des patients HAM/TSP est plus élevée que celle des

porteurs asymptomatiques. De plus, une étude a montré que les lymphocytes T CD4+ ou CD8+ mémoires issus d'individus infectés par HTLV-1 sont capables de proliférer spontanément in vitro, au contraire de leurs homologues naïfs (Prince et al., 1995), ce qui peut être corrélé avec l'élévation de la fréquence des lymphocytes T mémoires chez les individus infectés in vivo. En ce qui concerne les autres populations immunitaires sélectionnées dans notre étude, aucune différence de leur fréquence dans le sang n'est observée entre les donneurs sains, porteurs asymptomatiques et patients HAM/TSP. Ce résultat est similaire à celui publié dans une étude antérieure, qui en plus de cela n'observait pas de différences dans la fréquence des lymphocytes B, monocytes totaux et neutrophiles (Tattermusch et al., 2012), mais diffère d'autres études qui avaient observé une réduction de la fréquence des NK CD56+CD16+ et des cellules myéloïdes (Ndhlovu et al., 2009 ; Wu et al., 2000 ; Azakami et al., 2009 ; Manuel et al., 2013a). Ces différences d'observation pourraient être associées à des divergences de protocoles, des variations du nombre d'individus dans chaque catégorie clinique entre les études, d'un suivi thérapeutique ou non des patients ou encore de différences dans le choix du test statistique.

D'un point de vue global, notre étude a mis en évidence que peu de variations existaient dans la sensibilité des populations cellulaires à un stimulus exogène, et que ces variations semblent surtout concerner des populations immunitaires rares, telles que les lymphocytes T $\gamma\delta$  ou les cDC1, qui sont l'objet de peu d'investigations dans le contexte de l'infection par HTLV-1. En ce qui concerne les lymphocytes T $\gamma\delta$ , une étude précédente n'a pas observé de diminution de fréquence de la population globale de lymphocytes T $\gamma\delta$  entre des individus non infectés et des patients HAM/TSP (Saito et al., 2003), ce qui est similaire à ce que nous avons observé. Les patients HAM/TSP présentent une fréquence accrue de lymphocytes T $\gamma\delta$  circulants produisant de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-2 par rapport aux donneurs sains. Si la fonction des lymphocytes T $\gamma\delta$  dans le développement et/ou la régulation des différentes maladies inflammatoires chroniques ou auto-immunes n'est pas totalement compris (Pour revue : Fay et al., 2016 ; Pour revue : Blink and Miller, 2009), il a été suggéré que ces cellules contribuent potentiellement au processus de démyélinisation associé à la sclérose en plaques (Stinissen et al., 1995), mais aussi à l'aggravation des dommages de la moelle épinière via la production d'IFN- $\gamma$  (Sun et al., 2018). Définir si ces cellules contribuent effectivement au développement de l'HAM/TSP semble une perspective intéressante, au même titre que de déterminer si le phénotype immunitaire des lymphocytes T $\gamma\delta$  chez les patients HAM/TSP est associé à leur infection par HTLV-1, l'infection de ces cellules ayant été montrée in vitro (Yasukawa et al., 1992). Aucune étude ne s'est intéressée à la fonction spécifique des cellules dendritiques cDC1 lors de l'infection par

HTLV-1. Nous avons observé que certains patients HAM/TSP, à l'état basal, présentent une fréquence élevée de cDC1 exprimant l'IL-12, ce qui pourrait contribuer à renforcer la réponse Th1 observée chez les patients HAM/TSP, l'IL-12 produit par ces cellules étant notamment capable de promouvoir la réponse T cytotoxique des lymphocytes T CD8+ (Nizzoli et al., 2013). Il serait intéressant de vérifier si les patients qui ont une fréquence élevée de cDC1 exprimant l'IL-12 présentent également une augmentation de la concentration plasmatique d'IFN- $\gamma$ . Enfin, nous avons également observé que les lymphocytes T CD4+ et CD8+ mémoires des individus infectés produisaient moins d'IL-17A après la stimulation au PMA/Ionomycine. D'autres études ont déjà mis en évidence que les PBMCs issues d'individus infectés et de patients HAM/TSP sont déficientes pour la production de cette cytokine après stimulation par des peptides dérivés de *Mycobacterium tuberculosis* (Carvalho et al., 2018) ou par du PMA/Ionomycine (Leal et al., 2013). Les patients HAM/TSP présentent également une fréquence réduite de lymphocytes T CD4+CD25+CCR4+ exprimant de l'IL-17A par rapport aux donneurs sains (Yamano et al., 2009). Ainsi, il est possible qu'un déséquilibre entre la balance Th1/Th17 existe chez les patients HAM/TSP, au profit d'une élévation de la réponse Th1.

Les perspectives à court terme consistent à poursuivre l'analyse des données de cytométrie, en vérifiant notamment l'expression simultanée de plusieurs cytokines par les cellules de chaque population immunitaire en présence ou en absence d'une stimulation, et à établir si des corrélations existent entre les différents paramètres étudiés. Une étude récente a montré que la production de diverses cytokines par plusieurs populations de l'immunité innée après stimulation des TLR-3,-4,-7 et -8 était réduite pour des temps de stimulation courts chez les individus infectés par HIV-1 par rapport à des donneurs sains (Leite Pereira et al., 2018), ce qui pourrait contribuer à renforcer la mise en place d'infections opportunistes. Ainsi, des délais dans l'activation des cellules immunes pourraient aussi avoir lieu dans le cas des infections chroniques par HTLV-1, en plus de la dérégulation de populations discrètes que nous avons observée.

## **5. Repositionnement de la fonction des pDCs dans la symptomatologie viro-induite**

Contrairement à d'autres études antérieures (Azakami et al., 2009 ; Manuel et al., 2013a), nous n'avons pas observé de diminution de la fréquence des pDCs dans le sang des patients HAM/TSP en comparaison de donneurs sains ou de porteurs asymptomatiques. Notre résultat

est cependant en accord avec une autre étude dans laquelle un immunophénotypage des cellules sanguines de patients HAM/TSP était également réalisé à partir de sang total (Tattermusch et al., 2012), et selon laquelle aucune différence dans la fréquence des pDCs circulantes n'est observée entre les donneurs sains, porteurs asymptomatiques et patients HAM/TSP. Une des explications possibles entre cette divergence de résultats pourrait reposer sur une différence de protocole expérimental, puisque les deux premières études ont réalisé un immunophénotypage à partir de PBMCs isolés (Azakami et al., 2009 ; Manuel et al., 2013a). Des études antérieures, dans lesquelles les auteurs comparaient les résultats d'immunophénotypage obtenus sur des échantillons composés de PBMCs ou de sang total, ont déjà observé que lorsque l'immunomarquage est réalisé avec des PBMCs, la population de lymphocytes T CD8+ est partiellement perdue (Renzi and Ginns, 1987 ; Tamul et al., 1994). Des différences de compositions cellulaires qualitatives et/ou quantitatives entre le sang total et les PBMCs isolés pourraient potentiellement affecter la survie des pDCs par exemple. L'altération ou non de la fréquence des pDCs dans le sang des patients HAM/TSP reste donc controversée, d'autant que la diminution de fréquence de ces cellules observée dans les études précédentes (Azakami et al., 2009 ; Manuel et al., 2013a) pourrait aussi être associée à une migration de ces dernières dans le liquide céphalo-rachidien des patients HAM/TSP, comme observé dans le cadre d'autres maladies inflammatoires (Pashenkov et al., 2001).

Nous n'avons pas observé de différences dans la capacité des pDCs à produire de l'IFN- $\alpha$  entre les donneurs sains, porteurs asymptomatiques et patients HAM/TSP après une stimulation avec 10  $\mu$ M de R848, résultat similaire avec ce qui a été publié antérieurement (Tattermusch et al., 2012), mais en contradiction avec celui d'une autre étude, dans laquelle les pDCs de porteurs asymptomatiques purifiées et stimulées avec un agoniste de TLR-9 étaient déficientes dans la production d'IFN- $\alpha$  (Hishizawa et al., 2004). Ainsi, ceci suggère que les pDCs des individus infectés par HTLV-1 auraient une altération de la signalisation TLR-9 pour la production d'IFN- $\alpha$ , sans altération de la production d'IFN- $\alpha$  dépendante de la signalisation TLR-7. Cette hypothèse reste cependant à confirmer, d'une part en analysant dans nos données, non pas la fréquence des pDCs positives pour l'expression de l'IFN- $\alpha$ , mais le niveau d'expression de cette cytokine, à travers la comparaison des intensités de fluorescence moyenne, et d'autre part en comparant au sein d'une même étude les niveaux d'IFN- $\alpha$  produits par des pDCs stimulées soit avec du CpG, soit avec du R848, entre des individus infectés et des individus sains. Nous avons initialement prévu de stimuler les cellules du sang avec du CpG, mais avons obtenu des profils d'induction cytokiniques faibles voire inexistantes, en comparaison d'une stimulation

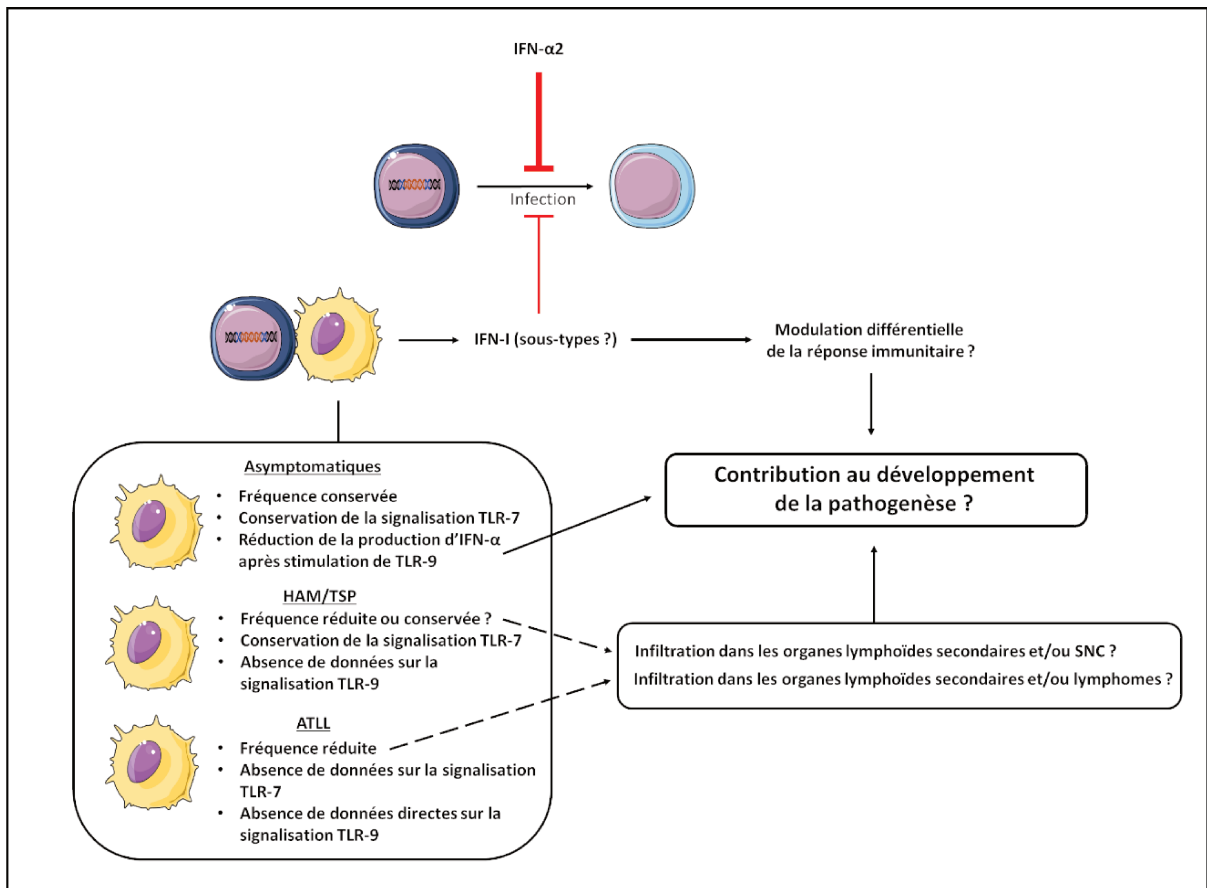
avec du R848. Ceci a également été observé dans une autre étude qui a établi le profil de réponse cytokinique de plusieurs populations immunitaires du sang total, après utilisation de plusieurs stimuli différents (Duffy et al., 2014). Là aussi, le CpG induisait une réponse cytokinique globale très faible par rapport à une stimulation avec du R848. Cette observation provient certainement du fait que les protéines plasmatiques sont capables d'inhiber la stimulation des cellules immunitaires par le CpG (Coch et al., 2013), ce qui en fait un outil délicat pour l'analyse des réponses immunitaires dans un système de sang total.

Si nous avons montré qu'HTLV-1 est capable d'induire la production d'IFN-I par les pDCs in vitro, aucune étude n'a mis en évidence si ces cellules étaient capables de produire de l'IFN-I in vivo, chez les individus infectés. Si les pDCs ne perdent pas leur sensibilité dans la production d'IFN- $\alpha$ , et notamment après stimulation de TLR-7, il est probable que la production d'IFN- $\alpha$  induite par la reconnaissance de HTLV-1, elle-même médiée par TLR-7, soit maintenue au cours de l'infection par ce virus. En effet, les patients HAM/TSP présentent des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> avec une sensibilité accrue à l'IFN- $\alpha$  par rapport aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> des porteurs asymptomatiques et des donneurs sains, ces cellules présentant des niveaux plus élevés de la forme phosphorylée de STAT1 en réponse à un traitement à l'IFN- $\alpha$  (Tattermusch et al., 2012). Aucune étude n'a cependant déterminé si cette signature de l'IFN-I est également présente chez les patients ATLL, ou au contraire si son absence pouvait constituer une divergence entre les deux maladies. Si le traitement antiviral avec de l'IFN-I montre des effets bénéfiques à la fois chez les patients ATLL et les patients HAM/TSP et permet de restaurer la réponse immunitaire, ceci suggère néanmoins que la réponse IFN-I endogène et propre à l'organisme, induite ou non par les pDCs, ne suffit pas à contrôler l'infection et/ou peut s'avérer favorable à la pathogenèse si elle est maintenue lors de l'infection chronique. Nous avons mis en évidence que les pDCs issues de donneurs sains étaient capables, après reconnaissance de HTLV-1 ou HTLV-2, de produire de l'IFN-I qui présente des propriétés antivirales similaires à l'IFN- $\alpha$  recombinant, du moins en ce qui concerne la prévention de l'infection des lymphocytes par HTLV-1. Cependant, pour une faible concentration d'IFN (10 U/mL), l'IFN- $\alpha$ 2a recombinant présente de meilleures propriétés antivirales dans notre système expérimental, en comparaison des surnageants produits par la pDC après coculture avec les cellules infectées par HTLV-1 et HTLV-2. Il serait intéressant d'évaluer la composition relative des différents IFN-I produits par les pDCs après reconnaissance de HTLV-1 ou HTLV-2, comme ce qui a déjà été réalisé pour HIV-1 (Harper et al., 2015), mais également de confirmer si l'IFN- $\alpha$ 2 est bien le sous-type d'IFN- $\alpha$  le plus

efficace pour inhiber l'infection par HTLV-1. En effet, les différents sous-types d'IFN- $\alpha$  n'ont pas les mêmes propriétés antivirales en fonction des virus (Pour revue : Berry, 2016). Par exemple, les sous-types d'IFN- $\alpha$  les plus efficaces pour inhiber l'infection médiée par HEV (Virus de l'hépatite E), HCV et HIV, correspondent respectivement à l'IFN- $\alpha$ 2, l'IFN- $\alpha$ 17 et l'IFN- $\alpha$ 14 (Pour revue : Berry, 2016 ; Lavender et al., 2016 ; Harper et al., 2015). En plus de leur effet antiviral direct, ces mêmes sous-types peuvent avoir des effets différents dans la modulation de la réponse immunitaire innée ou adaptative. Une étude a notamment observé que le traitement avec de l'IFN- $\alpha$ 14 de souris humanisées infectées par HIV-1 potentialise préférentiellement une réponse immunitaire innée, avec une augmentation de l'expression des facteurs de restriction et de leur activité ainsi qu'une augmentation de la fréquence de cellules NK exprimant TRAIL, alors que l'IFN- $\alpha$ 2 induit préférentiellement l'activation des lymphocytes T CD8+ (Lavender et al., 2016). De plus, le traitement avec de l'IFN- $\alpha$ 14, au contraire de l'IFN- $\alpha$ 2, réduit la charge virale et provirale et limite la déplétion des lymphocytes T CD4+, ce qui peut contribuer à limiter la pathogenèse associée à HIV-1 (Lavender et al., 2016). Ainsi, il serait intéressant d'évaluer quels sont les sous-types d'IFN-I produits par les pDC après reconnaissance de HTLV-1 et de définir si ces IFN-I, pris individuellement ou combinés, ont des propriétés qui favoriseraient le contrôle ou le développement des maladies associés à HTLV-1.

En conclusion, l'ensemble de nos travaux permet de mieux positionner les pDCs dans la pathogenèse associée à HTLV-1 (**Figure 52**), mais de nombreuses investigations sont nécessaires pour compléter ce modèle. En particulier, il est important de mieux définir comment les pDCs répondent à des stimulations exogènes qui ciblent à la fois TLR-7 et TLR-9, d'évaluer si la réduction de la fréquence des pDCs dans le sang est associée à une infiltration de ces cellules au niveau des sites d'infections (organes lymphoïdes secondaires, lymphomes, système nerveux central), si au niveau de ces sites, la composition des IFN-I produit par les pDCs peut moduler différenciellement les réponses immunitaires et enfin, si la reconnaissance des cellules infectées par les pDCs dans la phase chronique peut ou non favoriser la mise en place et/ou le maintien d'une réponse pro-inflammatoire chez les patients HAM/TSP ou d'une réponse immunosuppressive chez les patients ATLL.





**Figure 52 :** Modèle d'intégration des pDCs dans la pathogénèse induite par HTLV-1. Le potentiel antiviral de l'IFN-α2 recombinant ou de l'IFN produit par la pDC après coculture avec les cellules infectées par HTLV-1 est représenté en haut. La fréquence et la fonctionnalité des pDCs dans le cadre des maladies viro-induite sont représentées en bas à gauche.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Abdelbary, N.H., Abdullah, H.M., Matsuzaki, T., Hayashi, D., Tanaka, Y., Takashima, H., Izumo, S., and Kubota, R. (2011). Reduced Tim-3 expression on human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in HTLV-I infection. *J. Infect. Dis.* 203, 948–959.
- Aboud, M., Golde, D.W., Bersch, N., Rosenblatt, J.D., and Chen, I.S. (1987). A colony assay for in vitro transformation by human T cell leukemia viruses type I and type II. *Blood* 70, 432–436.
- Afonso, P.V., Mekaouche, M., Mortreux, F., Toulza, F., Moriceau, A., Wattel, E., Gessain, A., Bangham, C.R.M., Dubreuil, G., Plumelle, Y., et al. (2010). Highly active antiretroviral treatment against STLV-1 infection combining reverse transcriptase and HDAC inhibitors. *Blood* 116, 3802–3808.
- Agosto, L.M., Zhong, P., Munro, J., and Mothes, W. (2014). Highly active antiretroviral therapies are effective against HIV-1 cell-to-cell transmission. *PLoS Pathog.* 10, e1003982.
- Alais, S., Mahieux, R., and Dutartre, H. (2015). Viral Source-Independent High Susceptibility of Dendritic Cells to Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection Compared to That of T Lymphocytes. *J. Virol.* 89, 10580–10590.
- Alcumbre, S.G., Saint-André, V., Di Domizio, J., Vargas, P., Sirven, P., Bost, P., Maurin, M., Maiuri, P., Wery, M., Roman, M.S., et al. (2018). Diversification of human plasmacytoid dendritic cells in response to a single stimulus. *Nat. Immunol.* 19, 63–75.
- Almine, J.F., O’Hare, C.A.J., Dunphy, G., Haga, I.R., Naik, R.J., Atrih, A., Connolly, D.J., Taylor, J., Kelsall, I.R., Bowie, A.G., et al. (2017). IFI16 and cGAS cooperate in the activation of STING during DNA sensing in human keratinocytes. *Nat Commun* 8, 14392.
- Amorim, C.F., Souza, A.S., Diniz, A.G., Carvalho, N.B., Santos, S.B., and Carvalho, E.M. (2014). Functional activity of monocytes and macrophages in HTLV-1 infected subjects. *PLoS Negl Trop Dis* 8, e3399.
- Ando, H., Sato, T., Tomaru, U., Yoshida, M., Utsunomiya, A., Yamauchi, J., Araya, N., Yagishita, N., Coler-Reilly, A., Shimizu, Y., et al. (2013). Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy. *Brain* 136, 2876–2887.
- Aouar, B., Kovarova, D., Letard, S., Font-Haro, A., Florentin, J., Weber, J., Durantel, D., Chaperot, L., Plumas, J., Trejbalova, K., et al. (2016). Dual Role of the Tyrosine Kinase Syk in Regulation of Toll-Like Receptor Signaling in Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLoS ONE* 11, e0156063.
- Araya, N., Sato, T., Ando, H., Tomaru, U., Yoshida, M., Coler-Reilly, A., Yagishita, N., Yamauchi, J., Hasegawa, A., Kannagi, M., et al. (2014). HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells. *J. Clin. Invest.* 124, 3431–3442.
- Arimori, Y., Nakamura, R., Yamada, H., Shibata, K., Maeda, N., Kase, T., and Yoshikai, Y. (2013). Type I interferon limits influenza virus-induced acute lung injury by regulation of excessive inflammation in mice. *Antiviral Res.* 99, 230–237.
- Asselin-Paturel, C., Boonstra, A., Dalod, M., Durand, I., Yessaad, N., Dezutter-Dambuyant, C., Vicari, A., O’Garra, A., Biron, C., Brière, F., et al. (2001). Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat. Immunol.* 2, 1144–1150.
- Assil, S., Webster, B., and Dreux, M. (2015). Regulation of the Host Antiviral State by Intercellular Communications. *Viruses* 7, 4707–4733.
- Azakami, K., Sato, T., Araya, N., Utsunomiya, A., Kubota, R., Suzuki, K., Hasegawa, D., Izumi, T., Fujita, H., Aratani, S., et al. (2009). Severe loss of invariant NKT cells

- exhibiting anti-HTLV-1 activity in patients with HTLV-1-associated disorders. *Blood* 114, 3208–3215.
- Bai, X.T., and Nicot, C. (2012). Overview on HTLV-1 p12, p8, p30, p13: accomplices in persistent infection and viral pathogenesis. *Frontiers in Microbiology* 3.
- Bam, R.A., Hansen, D., Irrinki, A., Mulato, A., Jones, G.S., Hesselgesser, J., Frey, C.R., Cihlar, T., and Yant, S.R. (2017). TLR7 Agonist GS-9620 Is a Potent Inhibitor of Acute HIV-1 Infection in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61.
- Banerjee, P., Feuer, G., and Barker, E. (2007). Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) p12I down-modulates ICAM-1 and -2 and reduces adherence of natural killer cells, thereby protecting HTLV-1-infected primary CD4+ T cells from autologous natural killer cell-mediated cytotoxicity despite the reduction of major histocompatibility complex class I molecules on infected cells. *J. Virol.* 81, 9707–9717.
- Bangham, C.R.M., and Osame, M. (2005). Cellular immune response to HTLV-1. *Oncogene* 24, 6035–6046.
- Bangham, C.R.M., Cook, L.B., and Melamed, A. (2014). HTLV-1 clonality in adult T-cell leukaemia and non-malignant HTLV-1 infection. *Semin. Cancer Biol.* 26, 89–98.
- Bangham, C.R.M., Araujo, A., Yamano, Y., and Taylor, G.P. (2015). HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Nat Rev Dis Primers* 1, 15012.
- Bazarbachi, A., El-Sabban, M.E., Nasr, R., Quignon, F., Awaraji, C., Kersual, J., Dianoux, L., Zermati, Y., Haidar, J.H., Hermine, O., et al. (1999). Arsenic trioxide and interferon-alpha synergize to induce cell cycle arrest and apoptosis in human T-cell lymphotropic virus type I-transformed cells. *Blood* 93, 278–283.
- Bazarbachi, A., Plumelle, Y., Carlos Ramos, J., Tortevoeye, P., Otrrock, Z., Taylor, G., Gessain, A., Harrington, W., Panelatti, G., and Hermine, O. (2010). Meta-analysis on the use of zidovudine and interferon-alfa in adult T-cell leukemia/lymphoma showing improved survival in the leukemic subtypes. *J. Clin. Oncol.* 28, 4177–4183.
- Bellon, M., Baydoun, H.H., Yao, Y., and Nicot, C. (2010). HTLV-I Tax-dependent and -independent events associated with immortalization of human primary T lymphocytes. *Blood* 115, 2441–2448.
- Belrose, G., Gross, A., Olindo, S., Lézin, A., Dueymes, M., Komla-Soukha, I., Smadja, D., Tanaka, Y., Willems, L., Mesnard, J.-M., et al. (2011). Effects of valproate on Tax and HBZ expression in HTLV-1 and HAM/TSP T lymphocytes. *Blood* 118, 2483–2491.
- Bermejo-Jambrina, M., Eder, J., Helgers, L.C., Hertoghs, N., Nijmeijer, B.M., Stunnenberg, M., and Geijtenbeek, T.B.H. (2018). C-Type Lectin Receptors in Antiviral Immunity and Viral Escape. *Front Immunol* 9, 590.
- Berry, C.M. (2016). Understanding Interferon Subtype Therapy for Viral Infections: Harnessing the Power of the Innate Immune System. *Cytokine Growth Factor Rev.* 31, 83–90.
- Blackburn, S.D., and Wherry, E.J. (2007). IL-10, T cell exhaustion and viral persistence. *Trends in Microbiology* 15, 143–146.
- Blink, S.E., and Miller, S.D. (2009). The contribution of gammadelta T cells to the pathogenesis of EAE and MS. *Curr. Mol. Med.* 9, 15–22.
- Bloem, K., Vuist, I.M., van der Plas, A.-J., Knippels, L.M.J., Garssen, J., García-Vallejo, J.J., van Vliet, S.J., and van Kooyk, Y. (2013). Ligand binding and signaling of dendritic cell immunoreceptor (DCIR) is modulated by the glycosylation of the carbohydrate recognition domain. *PLoS ONE* 8, e66266.
- Bloem, K., Vuist, I.M., van den Berk, M., Klaver, E.J., van Die, I., Knippels, L.M.J., Garssen, J., García-Vallejo, J.J., van Vliet, S.J., and van Kooyk, Y. (2014). DCIR interacts with ligands from both endogenous and pathogenic origin. *Immunol. Lett.* 158, 33–41.

- Bolen, C.R., Robek, M.D., Brodsky, L., Schulz, V., Lim, J.K., Taylor, M.W., and Kleinstein, S.H. (2013). The blood transcriptional signature of chronic hepatitis C virus is consistent with an ongoing interferon-mediated antiviral response. *J. Interferon Cytokine Res.* 33, 15–23.
- Bonaccorsi, I., Cantoni, C., Carrega, P., Oliveri, D., Lui, G., Conte, R., Navarra, M., Cavaliere, R., Traggiai, E., Gattorno, M., et al. (2010). The immune inhibitory receptor LAIR-1 is highly expressed by plasmacytoid dendritic cells and acts complementary with NKp44 to control IFN $\alpha$  production. *PLoS ONE* 5, e15080.
- Boostani, R., Vakili, R., Hosseiny, S.S., Shoeibi, A., Fazeli, B., Etemadi, M.M., Sabet, F., Valizade, N., and Rezaee, S.A. (2015). Triple Therapy with Prednisolone, Pegylated Interferon and Sodium Valproate Improves Clinical Outcome and Reduces Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) Proviral Load, Tax and HBZ mRNA Expression in Patients with HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *Neurotherapeutics* 12, 887–895.
- Bosinger, S.E., Li, Q., Gordon, S.N., Klatt, N.R., Duan, L., Xu, L., Francella, N., Sidahmed, A., Smith, A.J., Cramer, E.M., et al. (2009). Global genomic analysis reveals rapid control of a robust innate response in SIV-infected sooty mangabeys. *J. Clin. Invest.* 119, 3556–3572.
- Brubaker, S.W., Bonham, K.S., Zanoni, I., and Kagan, J.C. (2015). Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 257–290.
- Bruni, D., Chazal, M., Sinigaglia, L., Chauveau, L., Schwartz, O., Desprès, P., and Jouvenet, N. (2015). Viral entry route determines how human plasmacytoid dendritic cells produce type I interferons. *Sci Signal* 8, ra25.
- Buschow, S.I., Biesta, P.J., Groothuisink, Z.M.A., Erler, N.S., Vanwollegem, T., Ho, E., Najera, I., Ait-Goughoulte, M., de Knecht, R.J., Boonstra, A., et al. (2018). TLR7 polymorphism, sex and chronic HBV infection influence plasmacytoid DC maturation by TLR7 ligands. *Antiviral Res.* 157, 27–37.
- Cachat, A., Chevalier, S.A., Alais, S., Ko, N.L., Ratner, L., Journo, C., Dutartre, H., and Mahieux, R. (2013). Alpha interferon restricts human T-lymphotropic virus type 1 and 2 de novo infection through PKR activation. *J. Virol.* 87, 13386–13396.
- Cachat, A., Alais, S., Chevalier, S.A., Journo, C., Fusil, F., Dutartre, H., Boniface, A., Ko, N.L., Gessain, A., Cosset, F.-L., et al. (2014). ADAR1 enhances HTLV-1 and HTLV-2 replication through inhibition of PKR activity. *Retrovirology* 11, 93.
- Cao, W., Bover, L., Cho, M., Wen, X., Hanabuchi, S., Bao, M., Rosen, D.B., Wang, Y.-H., Shaw, J.L., Du, Q., et al. (2009). Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction. *J. Exp. Med.* 206, 1603–1614.
- Cao, Y., Merling, A., Karsten, U., Goletz, S., Punzel, M., Kraft, R., Butschak, G., and Schwartz-Albiez, R. (2008). Expression of CD175 (Tn), CD175s (sialosyl-Tn) and CD176 (Thomsen-Friedenreich antigen) on malignant human hematopoietic cells. *Int. J. Cancer* 123, 89–99.
- Carranza, P., Del Río Estrada, P.M., Díaz Rivera, D., Ablanedo-Terrazas, Y., and Reyes-Terán, G. (2016). Lymph nodes from HIV-infected individuals harbor mature dendritic cells and increased numbers of PD-L1+ conventional dendritic cells. *Hum. Immunol.* 77, 584–593.
- Carvalho, N.B., de Lourdes Bastos, M., Souza, A.S., Netto, E.M., Arruda, S., Santos, S.B., and Carvalho, E.M. (2018). Impaired TNF, IL-1 $\beta$ , and IL-17 production and increased susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection in HTLV-1 infected individuals. *Tuberculosis (Edinb)* 108, 35–40.
- Castro-Amarante, M.F., Pise-Masison, C.A., McKinnon, K., Washington Parks, R., Galli, V., Omsland, M., Andresen, V., Massoud, R., Brunetto, G., Caruso, B., et al. (2015).

- Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Infection of the Three Monocyte Subsets Contributes to Viral Burden in Humans. *J. Virol.* 90, 2195–2207.
- Cerqueira, C., Liu, Y., Kühling, L., Chai, W., Hafezi, W., van Kuppevelt, T.H., Kühn, J.E., Feizi, T., and Schelhaas, M. (2013). Heparin increases the infectivity of Human Papillomavirus type 16 independent of cell surface proteoglycans and induces L1 epitope exposure. *Cell. Microbiol.* 15, 1818–1836.
- Chaperot, L., Blum, A., Manches, O., Lui, G., Angel, J., Molens, J.-P., and Plumas, J. (2006). Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* 176, 248–255.
- Charoenthongtrakul, S., Zhou, Q., Shembade, N., Harhaj, N.S., and Harhaj, E.W. (2011). Human T cell leukemia virus type 1 Tax inhibits innate antiviral signaling via NF- $\kappa$ B-dependent induction of SOCS1. *J. Virol.* 85, 6955–6962.
- Chaves, D.G., Sales, C.C., de Cássia Gonçalves, P., da Silva-Malta, M.C.F., Romanelli, L.C., Ribas, J.G., de Freitas Carneiro-Proietti, A.B., and Martins, M.L. (2016). Plasmatic proinflammatory chemokines levels are tricky markers to monitoring HTLV-1 carriers. *J. Med. Virol.* 88, 1438–1447.
- Chen, L., Borozan, I., Feld, J., Sun, J., Tannis, L.-L., Coltescu, C., Heathcote, J., Edwards, A.M., and McGilvray, I.D. (2005). Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology* 128, 1437–1444.
- Chevalier, S.A., Turpin, J., Cachat, A., Afonso, P.V., Gessain, A., Brady, J.N., Pise-Masison, C.A., and Mahieux, R. (2014). Gem-induced cytoskeleton remodeling increases cellular migration of HTLV-1-infected cells, formation of infected-to-target T-cell conjugates and viral transmission. *PLoS Pathog.* 10, e1003917.
- Chibueze, C.E., Yoshimitsu, M., and Arima, N. (2014). CD160 expression defines a uniquely exhausted subset of T lymphocytes in HTLV-1 infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453, 379–384.
- Christiansen, M.N., Chik, J., Lee, L., Anugraham, M., Abrahams, J.L., and Packer, N.H. (2014). Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics* 14, 525–546.
- Chun, T.-W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J.A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T.C., et al. (1997). Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387, 183–188.
- Ciminale, V., Rende, F., Bertazzoni, U., and Romanelli, M.G. (2014). HTLV-1 and HTLV-2: highly similar viruses with distinct oncogenic properties. *Front Microbiol* 5, 398.
- Coch, C., Lück, C., Schwickart, A., Putschli, B., Renn, M., Höller, T., Barchet, W., Hartmann, G., and Schlee, M. (2013). A human in vitro whole blood assay to predict the systemic cytokine response to therapeutic oligonucleotides including siRNA. *PLoS ONE* 8, e71057.
- Coler-Reilly, A.L.G., Sato, T., Matsuzaki, T., Nakagawa, M., Niino, M., Nagai, M., Nakamura, T., Takenouchi, N., Araya, N., Yagishita, N., et al. (2017). Effectiveness of Daily Prednisolone to Slow Progression of Human T-Lymphotropic Virus Type 1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis: A Multicenter Retrospective Cohort Study. *Neurotherapeutics* 14, 1084–1094.
- Colisson, R., Barblu, L., Gras, C., Raynaud, F., Hadj-Slimane, R., Pique, C., Hermine, O., Lepelletier, Y., and Herbeval, J.-P. (2010). Free HTLV-1 induces TLR7-dependent innate immune response and TRAIL relocalization in killer plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 115, 2177–2185.
- Collin, M., and Bigley, V. (2018). Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* 154, 3–20.

- Cook, L.B., Melamed, A., Niederer, H., Valganon, M., Laydon, D., Foroni, L., Taylor, G.P., Matsuoka, M., and Bangham, C.R.M. (2014). The role of HTLV-1 clonality, proviral structure, and genomic integration site in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 123, 3925–3931.
- Cosmi, L., Maggi, L., Santarlaschi, V., Liotta, F., and Annunziato, F. (2014). T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry A* 85, 36–42.
- Currer, R., Van Duyne, R., Jaworski, E., Guendel, I., Sampey, G., Das, R., Narayanan, A., and Kashanchi, F. (2012). HTLV Tax: A Fascinating Multifunctional Co-Regulator of Viral and Cellular Pathways. *Frontiers in Microbiology* 3.
- Daffis, S., Suthar, M.S., Szretter, K.J., Gale, M., and Diamond, M.S. (2009). Induction of IFN-beta and the innate antiviral response in myeloid cells occurs through an IPS-1-dependent signal that does not require IRF-3 and IRF-7. *PLoS Pathog.* 5, e1000607.
- Dahmouh, L., Hijazi, Y., Barnes, E., Stetler-Stevenson, M., and Abati, A. (2002). Adult T-cell leukemia/lymphoma: a cytopathologic, immunocytochemical, and flow cytometric study. *Cancer* 96, 110–116.
- Davidson, S., Crotta, S., McCabe, T.M., and Wack, A. (2014). Pathogenic potential of interferon  $\alpha\beta$  in acute influenza infection. *Nat Commun* 5, 3864.
- Décembre, E., Assil, S., Hillaire, M.L.B., Dejnirattisai, W., Mongkolsapaya, J., Screaton, G.R., Davidson, A.D., and Dreux, M. (2014). Sensing of immature particles produced by dengue virus infected cells induces an antiviral response by plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Pathog.* 10, e1004434.
- Dehé, A., Césaire, R., Désiré, N., Lézin, A., Bourdonné, O., Béra, O., Plumelle, Y., Smadja, D., and Nicolas, J.C. (2002). Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J. Virol. Methods* 102, 37–51.
- Delale, T., Paquin, A., Asselin-Paturel, C., Dalod, M., Brizard, G., Bates, E.E.M., Kastner, P., Chan, S., Akira, S., Vicari, A., et al. (2005). MyD88-dependent and -independent murine cytomegalovirus sensing for IFN-alpha release and initiation of immune responses in vivo. *J. Immunol.* 175, 6723–6732.
- Delamarre, L., Rosenberg, A.R., Pique, C., Pham, D., Callebaut, I., and Dokh elar, M.C. (1996). The HTLV-I envelope glycoproteins: structure and functions. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 13 Suppl 1, S85-91.
- Demontis, M.A., Sadiq, M.T., Golz, S., and Taylor, G.P. (2015). HTLV-1 viral RNA is detected rarely in plasma of HTLV-1 infected subjects. *J. Med. Virol.* 87, 2130–2134.
- Demoulin, S., Herfs, M., Delvenne, P., and Hubert, P. (2013). Tumor microenvironment converts plasmacytoid dendritic cells into immunosuppressive/tolerogenic cells: insight into the molecular mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* 93, 343–352.
- Derse, D., Hill, S.A., Lloyd, P.A., Chung Hk, null, and Morse, B.A. (2001). Examining human T-lymphotropic virus type 1 infection and replication by cell-free infection with recombinant virus vectors. *J. Virol.* 75, 8461–8468.
- Derse, D., Hill, S.A., Princler, G., Lloyd, P., and Heidecker, G. (2007). Resistance of human T cell leukemia virus type 1 to APOBEC3G restriction is mediated by elements in nucleocapsid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 2915–2920.
- Diani, E., Avesani, F., Bergamo, E., Cremonese, G., Bertazzoni, U., and Romanelli, M.G. (2015). HTLV-1 Tax protein recruitment into IKK $\epsilon$  and TBK1 kinase complexes enhances IFN-I expression. *Virology* 476, 92–99.
- Dierckx, T., Khouri, R., Menezes, S.M., Decanine, D., Farre, L., Bittencourt, A., Vandamme, A.M., and Van Weyenbergh, J. (2017). IFN- $\beta$  induces greater antiproliferative and proapoptotic effects and increased p53 signaling compared with IFN- $\alpha$  in PBMCs of Adult T-cell Leukemia/Lymphoma patients. *Blood Cancer J* 7, e519.

- Dimitrov, D.S., Willey, R.L., Sato, H., Chang, L.J., Blumenthal, R., and Martin, M.A. (1993). Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 infection kinetics. *J. Virol.* 67, 2182–2190.
- Dolganiuc, A., Chang, S., Kodys, K., Mandrekar, P., Bakis, G., Cormier, M., and Szabo, G. (2006). Hepatitis C virus (HCV) core protein-induced, monocyte-mediated mechanisms of reduced IFN-alpha and plasmacytoid dendritic cell loss in chronic HCV infection. *J. Immunol.* 177, 6758–6768.
- Donegan, E., Lee, H., Operskalski, E.A., Shaw, G.M., Kleinman, S.H., Busch, M.P., Stevens, C.E., Schiff, E.R., Nowicki, M.J., and Hollingsworth, C.G. (1994). Transfusion transmission of retroviruses: human T-lymphotropic virus types I and II compared with human immunodeficiency virus type 1. *Transfusion* 34, 478–483.
- D’Onofrio, C., Franzese, O., Puglianiello, A., Peci, E., Lanzilli, G., and Bonmassar, E. (1992). Antiviral activity of individual versus combined treatments with interferon alpha, beta and gamma on early infection with HTLV-I in vitro. *Int. J. Immunopharmacol.* 14, 1069–1079.
- Douceron, E., Kaidarova, Z., Miyazato, P., Matsuoka, M., Murphy, E.L., and Mahieux, R. (2012). HTLV-2 APH-2 expression is correlated with proviral load but APH-2 does not promote lymphocytosis. *J. Infect. Dis.* 205, 82–86.
- Dreux, M., Garaigorta, U., Boyd, B., Décembre, E., Chung, J., Whitten-Bauer, C., Wieland, S., and Chisari, F.V. (2012). Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell Host Microbe* 12, 558–570.
- Duan, X.-Z., Wang, M., Li, H.-W., Zhuang, H., Xu, D., and Wang, F.-S. (2004). Decreased frequency and function of circulating plasmacytoid dendritic cells (pDC) in hepatitis B virus infected humans. *J. Clin. Immunol.* 24, 637–646.
- Dubuisson, L., Lormières, F., Fochi, S., Turpin, J., Pasquier, A., Douceron, E., Oliva, A., Bazarbachi, A., Lallemand-Breitenbach, V., De Thé, H., et al. (2018). Stability of HTLV-2 antisense protein is controlled by PML nuclear bodies in a SUMO-dependent manner. *Oncogene* 37, 2806–2816.
- Duffy, D., Rouilly, V., Libri, V., Hasan, M., Beitz, B., David, M., Urrutia, A., Bisiaux, A., Labrie, S.T., Dubois, A., et al. (2014). Functional analysis via standardized whole-blood stimulation systems defines the boundaries of a healthy immune response to complex stimuli. *Immunity* 40, 436–450.
- Durbin, J.E., Fernandez-Sesma, A., Lee, C.K., Rao, T.D., Frey, A.B., Moran, T.M., Vukmanovic, S., García-Sastre, A., and Levy, D.E. (2000). Type I IFN modulates innate and specific antiviral immunity. *J. Immunol.* 164, 4220–4228.
- Dzionic, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Günther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., et al. (2001). BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J. Exp. Med.* 194, 1823–1834.
- Edwards, D., Fenizia, C., Gold, H., Castro-Amarante, M.F. de, Buchmann, C., Pise-Masison, C.A., and Franchini, G. (2011). Orf-I and Orf-II-Encoded Proteins in HTLV-1 Infection and Persistence. *Viruses* 3, 861–885.
- El-Sabban, M.E., Nasr, R., Dbaibo, G., Hermine, O., Abboushi, N., Quignon, F., Ameisen, J.C., Bex, F., de Thé, H., and Bazarbachi, A. (2000). Arsenic-interferon-alpha-triggered apoptosis in HTLV-I transformed cells is associated with tax down-regulation and reversal of NF-kappa B activation. *Blood* 96, 2849–2855.
- Faget, J., Bendriss-Vermare, N., Gobert, M., Durand, I., Olive, D., Biota, C., Bachelot, T., Treilleux, I., Goddard-Leon, S., Lavergne, E., et al. (2012). ICOS-ligand expression on



- plasmacytoid dendritic cells supports breast cancer progression by promoting the accumulation of immunosuppressive CD4<sup>+</sup> T cells. *Cancer Res.* 72, 6130–6141.
- Fanning, S.L., George, T.C., Feng, D., Feldman, S.B., Megjugorac, N.J., Izaguirre, A.G., and Fitzgerald-Bocarsly, P. (2006). Receptor cross-linking on human plasmacytoid dendritic cells leads to the regulation of IFN- $\alpha$  production. *J. Immunol.* 177, 5829–5839.
- Fay, N.S., Larson, E.C., and Jameson, J.M. (2016). Chronic Inflammation and  $\gamma\delta$  T Cells. *Front Immunol* 7, 210.
- Feldman, S.B., Ferraro, M., Zheng, H.M., Patel, N., Gould-Fogerite, S., and Fitzgerald-Bocarsly, P. (1994). Viral induction of low frequency interferon- $\alpha$  producing cells. *Virology* 204, 1–7.
- Feng, X., and Ratner, L. (2008). Human T-cell leukemia virus type 1 blunts signaling by interferon  $\alpha$ . *Virology* 374, 210–216.
- Feng, J., Misu, T., Fujihara, K., Saito, H., Takahashi, T., Kohnosu, T., Shiga, Y., Takeda, A., Sato, S., Takase, S., et al. (2003). Interferon- $\alpha$  significantly reduces cerebrospinal fluid CD4 cell subsets in HAM/TSP. *J. Neuroimmunol.* 141, 170–173.
- Feng, J., Misu, T., Fujihara, K., Misawa, N., Koyanagi, Y., Shiga, Y., Takeda, A., Sato, S., Takase, S., Kohnosu, T., et al. (2004). Th1/Th2 balance and HTLV-I proviral load in HAM/TSP patients treated with interferon- $\alpha$ . *J. Neuroimmunol.* 151, 189–194.
- Feng, Z., Li, Y., McKnight, K.L., Hensley, L., Lanford, R.E., Walker, C.M., and Lemon, S.M. (2015). Human pDCs preferentially sense enveloped hepatitis A virions. *J. Clin. Invest.* 125, 169–176.
- Fenizia, C., Fiocchi, M., Jones, K., Parks, R.W., Ceribelli, M., Chevalier, S.A., Edwards, D., Ruscetti, F., Pise-Masison, C.A., and Franchini, G. (2014). Human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 p30, but not p12/p8, counteracts toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 signaling in human monocytes and dendritic cells. *J. Virol.* 88, 393–402.
- Florentin, J., Aouar, B., Dental, C., Thumann, C., Firaguay, G., Gondois-Rey, F., Soumelis, V., Baumert, T.F., Nunès, J.A., Olive, D., et al. (2012). HCV glycoprotein E2 is a novel BDCA-2 ligand and acts as an inhibitor of IFN production by plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 120, 4544–4551.
- Flower cells of leukemia. *Blood* 115, 1668–1668.
- Fogarty, K.H., Zhang, W., Grigsby, I.F., Johnson, J.L., Chen, Y., Mueller, J.D., and Mansky, L.M. (2011). New insights into HTLV-1 particle structure, assembly, and Gag-Gag interactions in living cells. *Viruses* 3, 770–793.
- Font-Haro, A., Janovec, V., Hofman, T., Machala, L., Jilich, D., Melkova, Z., Weber, J., Trejbalova, K., and Hirsch, I. (2018). Expression of TIM-3 on Plasmacytoid Dendritic Cells as a Predictive Biomarker of Decline in HIV-1 RNA Level during ART. *Viruses* 10.
- Forlani, G., Abdallah, R., Accolla, R.S., and Tosi, G. (2013). The MHC-II transactivator CIITA, a restriction factor against oncogenic HTLV-1 and HTLV-2 retroviruses: similarities and differences in the inhibition of Tax-1 and Tax-2 viral transactivators. *Front Microbiol* 4, 234.
- Frenz, T., Graalman, L., Detje, C.N., Döring, M., Grabski, E., Scheu, S., and Kalinke, U. (2014). Independent of plasmacytoid dendritic cell (pDC) infection, pDC triggered by virus-infected cells mount enhanced type I IFN responses of different composition as opposed to pDC stimulated with free virus. *J. Immunol.* 193, 2496–2503.
- Fuchs, A., Cella, M., Kondo, T., and Colonna, M. (2005). Paradoxical inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44. *Blood* 106, 2076–2082.

- Fujihara, K., Itoyama, Y., Yu, F., Kubo, C., and Goto, I. (1991). Cellular immune surveillance against HTLV-I infected T lymphocytes in HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *J. Neurol. Sci.* 105, 99–107.
- Funk, E., Kottlilil, S., Gilliam, B., and Talwani, R. (2014). Tickling the TLR7 to cure viral hepatitis. *J Transl Med* 12, 129.
- Furuta, R., Yasunaga, J., Miura, M., Sugata, K., Saito, A., Akari, H., Ueno, T., Takenouchi, N., Fujisawa, J., Koh, K.-R., et al. (2017). Human T-cell leukemia virus type 1 infects multiple lineage hematopoietic cells in vivo. *PLOS Pathogens* 13, e1006722.
- Futsch, N., Mahieux, R., and Dutartre, H. (2017). HTLV-1, the Other Pathogenic Yet Neglected Human Retrovirus: From Transmission to Therapeutic Treatment. *Viruses* 10, 1.
- Gallo, R.C. (2005). History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. *Oncogene* 24, 5926–5930.
- García-Sastre, A., Durbin, R.K., Zheng, H., Palese, P., Gertner, R., Levy, D.E., and Durbin, J.E. (1998). The role of interferon in influenza virus tissue tropism. *J. Virol.* 72, 8550–8558.
- Germi, R., Crance, J.M., Garin, D., Zarski, J.P., and Drouet, E. (2001). Rôle des glycosaminoglycane dans l'adsorption des virus sur les cellules hôtes. *Virologie* 5, 255–263.
- Gessain, A., and Cassar, O. (2012). Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Frontiers in Microbiology* 3.
- Gessain, A., Barin, F., Vernant, J.C., Gout, O., Maurs, L., Calender, A., and de Thé, G. (1985). Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2, 407–410.
- Gessain, A., Gallo, R.C., and Franchini, G. (1992). Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift in vivo as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. *J. Virol.* 66, 2288–2295.
- GeurtsvanKessel, C.H., Willart, M.A.M., van Rijt, L.S., Muskens, F., Kool, M., Baas, C., Thielemans, K., Bennett, C., Clausen, B.E., Hoogsteden, H.C., et al. (2008). Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 205, 1621–1634.
- Ghany, M.G., Strader, D.B., Thomas, D.L., Seeff, L.B., and American Association for the Study of Liver Diseases (2009). Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 49, 1335–1374.
- Ghez, D., Lepelletier, Y., Lambert, S., Fourneau, J.-M., Blot, V., Janvier, S., Arnulf, B., van Endert, P.M., Heveker, N., Pique, C., et al. (2006). Neuropilin-1 Is Involved in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Entry. *Journal of Virology* 80, 6844–6854.
- Giam, C.-Z., and Semmes, O. (2016). HTLV-1 Infection and Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma—A Tale of Two Proteins: Tax and HBZ. *Viruses* 8, 161.
- Gill, P.S., Harrington, W., Kaplan, M.H., Ribeiro, R.C., Bennett, J.M., Liebman, H.A., Bernstein-Singer, M., Espina, B.M., Cabral, L., and Allen, S. (1995). Treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma with a combination of interferon alfa and zidovudine. *N. Engl. J. Med.* 332, 1744–1748.
- Gillet, N.A., Malani, N., Melamed, A., Gormley, N., Carter, R., Bentley, D., Berry, C., Bushman, F.D., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2011). The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T-cell clones. *Blood* 117, 3113–3122.
- Gilliet, M., Cao, W., and Liu, Y.-J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 594–606.

- Gonçalves, D.U., Proietti, F.A., Ribas, J.G.R., Araújo, M.G., Pinheiro, S.R., Guedes, A.C., and Carneiro-Proietti, A.B.F. (2010). Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 577–589.
- Grabski, E., Wappler, I., Pfaender, S., Steinmann, E., Haid, S., Dzionek, A., Pietschmann, T., and Kalinke, U. (2015). Efficient virus assembly, but not infectivity, determines the magnitude of hepatitis C virus-induced interferon alpha responses of plasmacytoid dendritic cells. *J. Virol.* 89, 3200–3208.
- Gramberg, T., Kahle, T., Bloch, N., Wittmann, S., Müllers, E., Daddacha, W., Hofmann, H., Kim, B., Lindemann, D., and Landau, N.R. (2013). Restriction of diverse retroviruses by SAMHD1. *Retrovirology* 10, 26.
- Gray, E.E., Winship, D., Snyder, J.M., Child, S.J., Geballe, A.P., and Stetson, D.B. (2016). The AIM2-like Receptors Are Dispensable for the Interferon Response to Intracellular DNA. *Immunity* 45, 255–266.
- Grey, F. (2015). Role of microRNAs in herpesvirus latency and persistence. *Journal of General Virology* 96, 739–751.
- Gross, C., and Thoma-Kress, A.K. (2016). Molecular Mechanisms of HTLV-1 Cell-to-Cell Transmission. *Viruses* 8, 74.
- Gross, C., Wiesmann, V., Millen, S., Kalmer, M., Wittenberg, T., Gettemans, J., and Thoma-Kress, A.K. (2016). The Tax-Inducible Actin-Bundling Protein Fascin Is Crucial for Release and Cell-to-Cell Transmission of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1). *PLoS Pathog.* 12, e1005916.
- Groussaud, D., Khair, M., Tollenaere, A.I., Waast, L., Kuo, M.-S., Mangeney, M., Martella, C., Fardini, Y., Coste, S., Souidi, M., et al. (2017). Hijacking of the O-GlcNAcZYME complex by the HTLV-1 Tax oncoprotein facilitates viral transcription. *PLoS Pathog.* 13, e1006518.
- Gudo, E.S., Silva-Barbosa, S.D., Linhares-Lacerda, L., Ribeiro-Alves, M., Real, S.C., Bou-Habib, D.C., and Savino, W. (2015). HAM/TSP-derived HTLV-1-infected T cell lines promote morphological and functional changes in human astrocytes cell lines: possible role in the enhanced T cells recruitment into Central Nervous System. *Virol. J.* 12, 165.
- Harper, M.S., Guo, K., Gibbert, K., Lee, E.J., Dillon, S.M., Barrett, B.S., McCarter, M.D., Hasenkrug, K.J., Dittmer, U., Wilson, C.C., et al. (2015). Interferon- $\alpha$  Subtypes in an Ex Vivo Model of Acute HIV-1 Infection: Expression, Potency and Effector Mechanisms. *PLoS Pathog.* 11, e1005254.
- Harrod, R., Kuo, Y.L., Tang, Y., Yao, Y., Vassilev, A., Nakatani, Y., and Giam, C.Z. (2000). p300 and p300/cAMP-responsive element-binding protein associated factor interact with human T-cell lymphotropic virus type-1 Tax in a multi-histone acetyltransferase/activator-enhancer complex. *J. Biol. Chem.* 275, 11852–11857.
- Hartmann, E., Wollenberg, B., Rothenfusser, S., Wagner, M., Wellisch, D., Mack, B., Giese, T., Gires, O., Endres, S., and Hartmann, G. (2003). Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res.* 63, 6478–6487.
- Hasegawa, H., Sawa, H., Lewis, M.J., Orba, Y., Sheehy, N., Yamamoto, Y., Ichinohe, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Katano, H., Takahashi, H., et al. (2006). Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat. Med.* 12, 466–472.
- Heaton, S.M., Borg, N.A., and Dixit, V.M. (2016). Ubiquitin in the activation and attenuation of innate antiviral immunity. *J. Exp. Med.* 213, 1–13.

- Hermine, O., Allard, I., Lévy, V., Arnulf, B., Gessain, A., Bazarbachi, A., and French ATL therapy group (2002). A prospective phase II clinical trial with the use of zidovudine and interferon-alpha in the acute and lymphoma forms of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Hematol. J.* 3, 276–282.
- Hiraiwa, N., Hiraiwa, M., and Kannagi, R. (1997). Human T-cell leukemia virus-1 encoded Tax protein transactivates alpha 1-->3 fucosyltransferase Fuc-T VII, which synthesizes sialyl Lewis X, a selectin ligand expressed on adult T-cell leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231, 183–186.
- Hiraiwa, N., Yabuta, T., Yoritomi, K., Hiraiwa, M., Tanaka, Y., Suzuki, T., Yoshida, M., and Kannagi, R. (2003). Transactivation of the fucosyltransferase VII gene by human T-cell leukemia virus type 1 Tax through a variant cAMP-responsive element. *Blood* 101, 3615–3621.
- Hirsch, I., Janovec, V., Stranska, R., and Bendriss-Vermare, N. (2017). Cross Talk between Inhibitory Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif-Signaling and Toll-Like Receptor Pathways in Macrophages and Dendritic Cells. *Front Immunol* 8, 394.
- Hishizawa, M., Imada, K., Kitawaki, T., Ueda, M., Kadowaki, N., and Uchiyama, T. (2004). Depletion and impaired interferon-alpha-producing capacity of blood plasmacytoid dendritic cells in human T-cell leukaemia virus type I-infected individuals. *British Journal of Haematology* 125, 568–575.
- Horlad, H., Ma, C., Yano, H., Pan, C., Ohnishi, K., Fujiwara, Y., Endo, S., Kikukawa, Y., Okuno, Y., Matsuoka, M., et al. (2016). An IL-27/Stat3 axis induces expression of programmed cell death 1 ligands (PD-L1/2) on infiltrating macrophages in lymphoma. *Cancer Sci.* 107, 1696–1704.
- Huang, X.-M., Liu, X.-S., Lin, X.-K., Yu, H., Sun, J.-Y., Liu, X.-K., Chen, C., Jin, H.-L., Zhang, G.-E., Shi, X.-X., et al. (2014). Role of plasmacytoid dendritic cells and inducible costimulator-positive regulatory T cells in the immunosuppression microenvironment of gastric cancer. *Cancer Sci.* 105, 150–158.
- Hulme, A.E., Perez, O., and Hope, T.J. (2011). Complementary assays reveal a relationship between HIV-1 uncoating and reverse transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 9975–9980.
- Hyun, J., Ramos, J.C., Toomey, N., Balachandran, S., Lavorgna, A., Harhaj, E., and Barber, G.N. (2015). Oncogenic human T-cell lymphotropic virus type 1 tax suppression of primary innate immune signaling pathways. *J. Virol.* 89, 4880–4893.
- Igakura, T., Stinchcombe, J.C., Goon, P.K.C., Taylor, G.P., Weber, J.N., Griffiths, G.M., Tanaka, Y., Osame, M., and Bangham, C.R.M. (2003). Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* 299, 1713–1716.
- Ijichi, S., Ramundo, M.B., Takahashi, H., and Hall, W.W. (1992). In vivo cellular tropism of human T cell leukemia virus type II (HTLV-II). *J. Exp. Med.* 176, 293–296.
- Ijichi, S., Izumo, S., Nagai, M., Shinmyozu, K., Hall, W.W., and Osame, M. (1995). Anti-viral and immunomodulatory effects of interferon-alpha on cultured lymphocytes from patients with human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). *J. Neuroimmunol.* 61, 213–221.
- Ilinskaya, A., Derse, D., Hill, S., Princler, G., and Heidecker, G. (2013). Cell-cell transmission allows human T-lymphotropic virus 1 to circumvent tetherin restriction. *Virology* 436, 201–209.
- Imai, M., Higuchi, M., Kawamura, H., Yoshita, M., Takahashi, M., Oie, M., Matsuki, H., Tanaka, Y., Aoyagi, Y., and Fujii, M. (2013). Human T cell leukemia virus type 2 (HTLV-2) Tax2 has a dominant activity over HTLV-1 Tax1 to immortalize human CD4+ T cells. *Virus Genes* 46, 39–46.

- Inagaki, A., Ishida, T., Ishii, T., Komatsu, H., Iida, S., Ding, J., Yonekura, K., Takeuchi, S., Takatsuka, Y., Utsunomiya, A., et al. (2006). Clinical significance of serum Th1-, Th2- and regulatory T cells-associated cytokines in adult T-cell leukemia/lymphoma: high interleukin-5 and -10 levels are significant unfavorable prognostic factors. *Int. J. Cancer* 118, 3054–3061.
- Ishida, T., Iida, S., Akatsuka, Y., Ishii, T., Miyazaki, M., Komatsu, H., Inagaki, H., Okada, N., Fujita, T., Shitara, K., et al. (2004). The CC chemokine receptor 4 as a novel specific molecular target for immunotherapy in adult T-Cell leukemia/lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 10, 7529–7539.
- Ishida, T., Jo, T., Takemoto, S., Suzushima, H., Uozumi, K., Yamamoto, K., Uike, N., Saburi, Y., Nosaka, K., Utsunomiya, A., et al. (2015). Dose-intensified chemotherapy alone or in combination with mogamulizumab in newly diagnosed aggressive adult T-cell leukaemia-lymphoma: a randomized phase II study. *Br. J. Haematol.* 169, 672–682.
- Ito, T., Kanzler, H., Duramad, O., Cao, W., and Liu, Y.-J. (2006). Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 107, 2423–2431.
- Ito, T., Yang, M., Wang, Y.-H., Lande, R., Gregorio, J., Perng, O.A., Qin, X.-F., Liu, Y.-J., and Gilliet, M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J. Exp. Med.* 204, 105–115.
- Ivashkiv, L.B., and Donlin, L.T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 36–49.
- Jacquelin, B., Mayau, V., Targat, B., Liovat, A.-S., Kunkel, D., Petitjean, G., Dillies, M.-A., Roques, P., Butor, C., Silvestri, G., et al. (2009). Nonpathogenic SIV infection of African green monkeys induces a strong but rapidly controlled type I IFN response. *J. Clin. Invest.* 119, 3544–3555.
- Jain, P., Manuel, S.L., Khan, Z.K., Ahuja, J., Quann, K., and Wigdahl, B. (2009). DC-SIGN mediates cell-free infection and transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 by dendritic cells. *J. Virol.* 83, 10908–10921.
- Janovec, V., Aouar, B., Font-Haro, A., Hofman, T., Trejbalova, K., Weber, J., Chaperot, L., Plumas, J., Olive, D., Dubreuil, P., et al. (2018). The MEK1/2-ERK Pathway Inhibits Type I IFN Production in Plasmacytoid Dendritic Cells. *Front Immunol* 9, 364.
- Jassal, S.R., Pöhler, R.G., and Brighty, D.W. (2001). Human T-cell leukemia virus type 1 receptor expression among syncytium-resistant cell lines revealed by a novel surface glycoprotein-immuno-adhesin. *J. Virol.* 75, 8317–8328.
- Jégouzo, S.A.F., Feinberg, H., Dungarwalla, T., Drickamer, K., Weis, W.I., and Taylor, M.E. (2015). A Novel Mechanism for Binding of Galactose-terminated Glycans by the C-type Carbohydrate Recognition Domain in Blood Dendritic Cell Antigen 2. *J. Biol. Chem.* 290, 16759–16771.
- Jensen, S., and Thomsen, A.R. (2012). Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. *J. Virol.* 86, 2900–2910.
- Jewell, N.A., Vaghefi, N., Mertz, S.E., Akter, P., Peebles, R.S., Bakaletz, L.O., Durbin, R.K., Flaño, E., and Durbin, J.E. (2007). Differential type I interferon induction by respiratory syncytial virus and influenza A virus in vivo. *J. Virol.* 81, 9790–9800.
- Jin, Q., Agrawal, L., VanHorn-Ali, Z., and Alkhatib, G. (2006). Infection of CD4+ T lymphocytes by the human T cell leukemia virus type 1 is mediated by the glucose transporter GLUT-1: evidence using antibodies specific to the receptor's large extracellular domain. *Virology* 349, 184–196.
- Jin, Q., Alkhatib, B., Cornetta, K., and Alkhatib, G. (2010). Alternate receptor usage of neuropilin-1 and glucose transporter protein 1 by the human T cell leukemia virus type 1. *Virology* 396, 203–212.

- Jones, K.S., Petrow-Sadowski, C., Bertolette, D.C., Huang, Y., and Ruscetti, F.W. (2005). Heparan Sulfate Proteoglycans Mediate Attachment and Entry of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Virions into CD4+ T Cells. *Journal of Virology* 79, 12692–12702.
- Jones, K.S., Fugo, K., Petrow-Sadowski, C., Huang, Y., Bertolette, D.C., Lisinski, I., Cushman, S.W., Jacobson, S., and Ruscetti, F.W. (2006). Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells. *J. Virol.* 80, 8291–8302.
- Jones, K.S., Petrow-Sadowski, C., Huang, Y.K., Bertolette, D.C., and Ruscetti, F.W. (2008). Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nat. Med.* 14, 429–436.
- Jones, K.S., Lambert, S., Bouttier, M., Bénit, L., Ruscetti, F.W., Hermine, O., and Pique, C. (2011). Molecular aspects of HTLV-1 entry: functional domains of the HTLV-1 surface subunit (SU) and their relationships to the entry receptors. *Viruses* 3, 794–810.
- Kagdi, H., Demontis, M.A., Ramos, J.C., and Taylor, G.P. (2018). Switching and loss of cellular cytokine producing capacity characterize in vivo viral infection and malignant transformation in human T-lymphotropic virus type 1 infection. *PLoS Pathog.* 14, e1006861.
- Kagdi, H.H., Demontis, M.A., Fields, P.A., Ramos, J.C., Bangham, C.R.M., and Taylor, G.P. (2017). Risk stratification of adult T-cell leukemia/lymphoma using immunophenotyping. *Cancer Med* 6, 298–309.
- Kalyanaraman, V.S., Sarngadharan, M.G., Robert-Guroff, M., Miyoshi, I., Golde, D., and Gallo, R.C. (1982). A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* 218, 571–573.
- Kambara, C., Nakamura, T., Furuya, T., Nishiura, Y., Kawakami, A., Ichinose, K., Shirabe, S., and Eguchi, K. (2002). Increased sialyl Lewis(x) antigen-positive cells mediated by HTLV-1 infection in peripheral blood CD4(+) T lymphocytes in patients with HTLV-1-associated myelopathy. *J. Neuroimmunol.* 125, 179–184.
- Kannian, P., Yin, H., Doueiri, R., Lairmore, M.D., Fernandez, S., and Green, P.L. (2012). Distinct transformation tropism exhibited by human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 is the result of postinfection T cell clonal expansion. *J. Virol.* 86, 3757–3766.
- Katsuya, H., Ishitsuka, K., Utsunomiya, A., Hanada, S., Eto, T., Moriuchi, Y., Saburi, Y., Miyahara, M., Sueoka, E., Uike, N., et al. (2015). Treatment and survival among 1594 patients with ATL. *Blood* 126, 2570–2577.
- Kchour, G., Tarhini, M., Kooshyar, M.-M., El Hajj, H., Wattel, E., Mahmoudi, M., Hatoum, H., Rahimi, H., Maleki, M., Rafatpanah, H., et al. (2009). Phase 2 study of the efficacy and safety of the combination of arsenic trioxide, interferon alpha, and zidovudine in newly diagnosed chronic adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL). *Blood* 113, 6528–6532.
- Kchour, G., Rezaee, R., Farid, R., Ghantous, A., Rafatpanah, H., Tarhini, M., Kooshyar, M.-M., El Hajj, H., Berry, F., Mortada, M., et al. (2013). The combination of arsenic, interferon-alpha, and zidovudine restores an “immunocompetent-like” cytokine expression profile in patients with adult T-cell leukemia lymphoma. *Retrovirology* 10, 91.
- Kim, S.J., Kehrl, J.H., Burton, J., Tandler, C.L., Jeang, K.T., Danielpour, D., Thevenin, C., Kim, K.Y., Sporn, M.B., and Roberts, A.B. (1990). Transactivation of the transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) gene by human T lymphotropic virus type 1 tax: a potential mechanism for the increased production of TGF-beta 1 in adult T cell leukemia. *J. Exp. Med.* 172, 121–129.

- Kinpara, S., Hasegawa, A., Utsunomiya, A., Nishitsuji, H., Furukawa, H., Masuda, T., and Kannagi, M. (2009). Stromal cell-mediated suppression of human T-cell leukemia virus type 1 expression in vitro and in vivo by type I interferon. *J. Virol.* 83, 5101–5108.
- Kinpara, S., Kijiyama, M., Takamori, A., Hasegawa, A., Sasada, A., Masuda, T., Tanaka, Y., Utsunomiya, A., and Kannagi, M. (2013). Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) suppresses HTLV-1 gene expression and cell cycling, while IFN- $\alpha$  combined with zidovudine induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-1-infected cells. *Retrovirology* 10, 52.
- Koerner, I., Kochs, G., Kalinke, U., Weiss, S., and Staeheli, P. (2007). Protective role of beta interferon in host defense against influenza A virus. *J. Virol.* 81, 2025–2030.
- Koyanagi, Y., Itoyama, Y., Nakamura, N., Takamatsu, K., Kira, J., Iwamasa, T., Goto, I., and Yamamoto, N. (1993). In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology* 196, 25–33.
- Kozako, T., Arima, N., Toji, S., Masamoto, I., Akimoto, M., Hamada, H., Che, X.-F., Fujiwara, H., Matsushita, K., Tokunaga, M., et al. (2006). Reduced frequency, diversity, and function of human T cell leukemia virus type 1-specific CD8+ T cell in adult T cell leukemia patients. *J. Immunol.* 177, 5718–5726.
- Kozako, T., Yoshimitsu, M., Fujiwara, H., Masamoto, I., Horai, S., White, Y., Akimoto, M., Suzuki, S., Matsushita, K., Uozumi, K., et al. (2009). PD-1/PD-L1 expression in human T-cell leukemia virus type 1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients. *Leukemia* 23, 375–382.
- Kozako, T., Yoshimitsu, M., Akimoto, M., White, Y., Matsushita, K., Soeda, S., Shimeno, H., Kubota, R., Izumo, S., and Arima, N. (2011). Programmed death-1 (PD-1)/PD-1 ligand pathway-mediated immune responses against human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and carriers with autoimmune disorders. *Hum. Immunol.* 72, 1001–1006.
- Krug, A., French, A.R., Barchet, W., Fischer, J.A.A., Dzionek, A., Pingel, J.T., Orihuela, M.M., Akira, S., Yokoyama, W.M., and Colonna, M. (2004). TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 21, 107–119.
- Kubota, R., Soldan, S.S., Martin, R., and Jacobson, S. (2002). Selected cytotoxic T lymphocytes with high specificity for HTLV-I in cerebrospinal fluid from a HAM/TSP patient. *J. Neurovirol.* 8, 53–57.
- Kulkarni, A., and Bangham, C.R.M. (2018). HTLV-1: Regulating the Balance Between Proviral Latency and Reactivation. *Front Microbiol* 9, 449.
- Kumagai, Y., Takeuchi, O., Kato, H., Kumar, H., Matsui, K., Morii, E., Aozasa, K., Kawai, T., and Akira, S. (2007). Alveolar macrophages are the primary interferon-alpha producer in pulmonary infection with RNA viruses. *Immunity* 27, 240–252.
- Kuroda, Y., Kurohara, K., Fujiyama, F., Takashima, H., Endo, C., Matsui, M., Neshige, R., and Kakigi, R. (1992). Systemic interferon-alpha in the treatment of HTLV-I-associated myelopathy. *Acta Neurol. Scand.* 86, 82–86.
- Labidi-Galy, S.I., Sisirak, V., Meeus, P., Gobert, M., Treilleux, I., Bajard, A., Combes, J.-D., Faget, J., Mithieux, F., Cassagnol, A., et al. (2011). Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer. *Cancer Res.* 71, 5423–5434.
- Lambert, S., Bouttier, M., Vassy, R., Seigneuret, M., Petrow-Sadowski, C., Janvier, S., Heveker, N., Ruscetti, F.W., Perret, G., Jones, K.S., et al. (2009). HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. *Blood* 113, 5176–5185.

- Lambert, S., Bouttier, M., Ghez, D., Hermine, O., and Pique, C. (2012). Les récepteurs d'entrée du HTLV-1 : un ménage à trois. *Virologie* 16, 148–157.
- Lang, T., and Mansell, A. (2007). The negative regulation of Toll-like receptor and associated pathways. *Immunol. Cell Biol.* 85, 425–434.
- Lavender, K.J., Gibbert, K., Peterson, K.E., Van Dis, E., Francois, S., Woods, T., Messer, R.J., Gawanbacht, A., Müller, J.A., Münch, J., et al. (2016). Interferon Alpha Subtype-Specific Suppression of HIV-1 Infection In Vivo. *J. Virol.* 90, 6001–6013.
- Le Blanc, I., Grange, M.P., Delamarre, L., Rosenberg, A.R., Blot, V., Pique, C., and Dokh lar, M.C. (2001). HTLV-1 structural proteins. *Virus Res.* 78, 5–16.
- Le Mercier, I., Poujol, D., Sanlaville, A., Sisirak, V., Gobert, M., Durand, I., Dubois, B., Treilleux, I., Marvel, J., Vlach, J., et al. (2013). Tumor promotion by intratumoral plasmacytoid dendritic cells is reversed by TLR7 ligand treatment. *Cancer Res.* 73, 4629–4640.
- Leal, F.E., Ndhlovu, L.C., Hasenkrug, A.M., Bruno, F.R., Carvalho, K.I., Wynn-Williams, H., Neto, W.K., Sanabani, S.S., Segurado, A.C., Nixon, D.F., et al. (2013). Expansion in CD39<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> immunoregulatory t cells and rarity of Th17 cells in HTLV-1 infected patients is associated with neurological complications. *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2028.
- Leal, F.E., Menezes, S.M., Costa, E.A.S., Brailey, P.M., Gama, L., Segurado, A.C., Kallas, E.G., Nixon, D.F., Dierckx, T., Khouri, R., et al. (2018). Comprehensive Antiretroviral Restriction Factor Profiling Reveals the Evolutionary Imprint of the ex Vivo and in Vivo IFN- $\beta$  Response in HTLV-1-Associated Neuroinflammation. *Front Microbiol* 9, 985.
- Lee, H.K., Lund, J.M., Ramanathan, B., Mizushima, N., and Iwasaki, A. (2007). Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* 315, 1398–1401.
- Lehky, T.J., Fox, C.H., Koenig, S., Levin, M.C., Flerlage, N., Izumo, S., Sato, E., Raine, C.S., Osame, M., and Jacobson, S. (1995). Detection of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax RNA in the central nervous system of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by in situ hybridization. *Ann. Neurol.* 37, 167–175.
- Leite Pereira, A., Tchitchek, N., Marcos Lopez, E., Lambotte, O., Le Grand, R., and Cosma, A. (2018). A high-resolution mass cytometry analysis reveals a delay of cytokines production after TLR4 or TLR7/8 engagements in HIV-1 infected humans. *Cytokine* 111, 97–105.
- Lepelley, A., Louis, S., Sourisseau, M., Law, H.K.W., Pothlichet, J., Schilte, C., Chaperot, L., Plumas, J., Randall, R.E., Si-Tahar, M., et al. (2011). Innate sensing of HIV-infected cells. *PLoS Pathog.* 7, e1001284.
- Levin, M.C., Rosenblum, M.K., Fox, C.H., and Jacobson, S. (2001). Localization of retrovirus in the central nervous system of a patient co-infected with HTLV-1 and HIV with HAM/TSP and HIV-associated dementia. *J. Neurovirol.* 7, 61–65.
- Li, G., Cheng, M., Nunoya, J.-I., Cheng, L., Guo, H., Yu, H., Liu, Y.-J., Su, L., and Zhang, L. (2014a). Plasmacytoid dendritic cells suppress HIV-1 replication but contribute to HIV-1 induced immunopathogenesis in humanized mice. *PLoS Pathog.* 10, e1004291.
- Li, H., Gillis, J., Johnson, R.P., and Reeves, R.K. (2013). Multi-functional plasmacytoid dendritic cells redistribute to gut tissues during simian immunodeficiency virus infection. *Immunology* 140, 244–249.
- Li, H., Goepfert, P., and Reeves, R.K. (2014b). Short communication: Plasmacytoid dendritic cells from HIV-1 Elite Controllers maintain a gut-homing phenotype associated with immune activation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 30, 1213–1215.



- Li, K., Zhang, S., Kronqvist, M., Wallin, M., Ekström, M., Derse, D., and Garoff, H. (2008). Intersubunit disulfide isomerization controls membrane fusion of human T-cell leukemia virus. *Env. J. Virol.* 82, 7135–7143.
- Lin, Y.-L., Lei, H.-Y., Lin, Y.-S., Yeh, T.-M., Chen, S.-H., and Liu, H.-S. (2002). Heparin inhibits dengue-2 virus infection of five human liver cell lines. *Antiviral Res.* 56, 93–96.
- Lorenzo-Redondo, R., Fryer, H.R., Bedford, T., Kim, E.-Y., Archer, J., Kosakovsky Pond, S.L., Chung, Y.-S., Penugonda, S., Chipman, J.G., Fletcher, C.V., et al. (2016). Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature* 530, 51–56.
- Ma, G., Yasunaga, J., and Matsuoka, M. (2016). Multifaceted functions and roles of HBZ in HTLV-1 pathogenesis. *Retrovirology* 13.
- Macal, M., Jo, Y., Dallari, S., Chang, A.Y., Dai, J., Swaminathan, S., Wehrens, E.J., Fitzgerald-Bocarsly, P., and Zúñiga, E.I. (2018). Self-Renewal and Toll-like Receptor Signaling Sustain Exhausted Plasmacytoid Dendritic Cells during Chronic Viral Infection. *Immunity* 48, 730-744.e5.
- Macatonia, S.E., Cruickshank, J.K., Rudge, P., and Knight, S.C. (1992). Dendritic Cells from Patients with Tropical Spastic Paraparesis Are Infected with HTLV-1 and Stimulate Autologous Lymphocyte Proliferation. *AIDS Research and Human Retroviruses* 8, 1699–1706.
- Macchi, B., D’Onofrio, C., Labianca, R.A., and Bonmassar, E. (1990). Mononuclear cells from peripheral blood of adult donors and from cord blood are equally protected by alpha- and beta-interferons against infection with HTLV-I. *Pharmacol. Res.* 22, 503–514.
- Macchi, B., Faraoni, I., Zhang, J., Grelli, S., Favalli, C., Mastino, A., and Bonmassar, E. (1997). AZT inhibits the transmission of human T cell leukaemia/lymphoma virus type I to adult peripheral blood mononuclear cells in vitro. *J. Gen. Virol.* 78 ( Pt 5), 1007–1016.
- Macchi, B., Balestrieri, E., Frezza, C., Grelli, S., Valletta, E., Marçais, A., Marino-Merlo, F., Turpin, J., Bangham, C.R., Hermine, O., et al. (2017). Quantification of HTLV-1 reverse transcriptase activity in ATL patients treated with zidovudine and interferon- $\alpha$ . *Blood Adv* 1, 748–752.
- Machmach, K., Leal, M., Gras, C., Viciana, P., Genebat, M., Franco, E., Boufassa, F., Lambotte, O., Herbeuval, J.P., and Ruiz-Mateos, E. (2012). Plasmacytoid dendritic cells reduce HIV production in elite controllers. *J. Virol.* 86, 4245–4252.
- Mahieux, R., and Gessain, A. (2011). HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 viruses: discovery, epidemiology, serology and molecular aspects. *Viruses* 3, 1074–1090.
- Mahieux, R., Pise-Masison, C., Gessain, A., Brady, J.N., Olivier, R., Perret, E., Misteli, T., and Nicot, C. (2001). Arsenic trioxide induces apoptosis in human T-cell leukemia virus type 1- and type 2-infected cells by a caspase-3-dependent mechanism involving Bcl-2 cleavage. *Blood* 98, 3762–3769.
- Mahieux, R., Suspène, R., Delebecque, F., Henry, M., Schwartz, O., Wain-Hobson, S., and Vartanian, J.-P. (2005). Extensive editing of a small fraction of human T-cell leukemia virus type 1 genomes by four APOBEC3 cytidine deaminases. *J. Gen. Virol.* 86, 2489–2494.
- Makino, M., Wakamatsu, S., Shimokubo, S., Arima, N., and Baba, M. (2000). Production of functionally deficient dendritic cells from HTLV-I-infected monocytes: implications for the dendritic cell defect in adult T cell leukemia. *Virology* 274, 140–148.
- Mandl, J.N., Barry, A.P., Vanderford, T.H., Kozyr, N., Chavan, R., Klucking, S., Barrat, F.J., Coffman, R.L., Staprans, S.I., and Feinberg, M.B. (2008). Divergent TLR7 and TLR9

- signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections. *Nat. Med.* 14, 1077–1087.
- Manel, N., Kim, F.J., Kinet, S., Taylor, N., Sitbon, M., and Battini, J.-L. (2003). The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell* 115, 449–459.
- Mansky, L.M. (2000). In vivo analysis of human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcription accuracy. *J. Virol.* 74, 9525–9531.
- Manuel, S.L., Sehgal, M., Khan, Z.K., Goedert, J.J., Betts, M.R., and Jain, P. (2013a). An altered maturation and adhesion phenotype of dendritic cells in diseased individuals compared to asymptomatic carriers of human T cell leukemia virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 29, 1273–1285.
- Manuel, S.L., Sehgal, M., Connolly, J., Makedonas, G., Khan, Z.K., Gardner, J., Betts, M.R., and Jain, P. (2013b). Lack of recall response to Tax in ATL and HAM/TSP patients but not in asymptomatic carriers of human T-cell leukemia virus type 1. *J. Clin. Immunol.* 33, 1223–1239.
- Martin, J.L., Maldonado, J.O., Mueller, J.D., Zhang, W., and Mansky, L.M. (2016). Molecular Studies of HTLV-1 Replication: An Update. *Viruses* 8.
- Martinelli, E., Cicala, C., Van Ryk, D., Goode, D.J., Macleod, K., Arthos, J., and Fauci, A.S. (2007). HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN- $\alpha$  secretion in plasmacytoid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 3396–3401.
- Martinet, J., Dufeu-Duchesne, T., Bruder Costa, J., Larrat, S., Marlu, A., Leroy, V., Plumas, J., and Aspod, C. (2012). Altered functions of plasmacytoid dendritic cells and reduced cytolytic activity of natural killer cells in patients with chronic HBV infection. *Gastroenterology* 143, 1586-1596.e8.
- Marusawa, H., Uemoto, S., Hijikata, M., Ueda, Y., Tanaka, K., Shimotohno, K., and Chiba, T. (2000). Latent hepatitis B virus infection in healthy individuals with antibodies to hepatitis B core antigen. *Hepatology* 31, 488–495.
- Masaki, A., Ishida, T., Suzuki, S., Ito, A., Narita, T., Kinoshita, S., Ri, M., Kusumoto, S., Komatsu, H., Inagaki, H., et al. (2018). Human T-cell lymphotropic/leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax-specific T-cell exhaustion in HTLV-1-infected individuals. *Cancer Sci.*
- Matsumoto, K., Shibata, H., Fujisawa, J.I., Inoue, H., Hakura, A., Tsukahara, T., and Fujii, M. (1997). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein transforms rat fibroblasts via two distinct pathways. *J. Virol.* 71, 4445–4451.
- Matsuoka, M., and Jeang, K.-T. (2007). Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nature Reviews Cancer* 7, 270–280.
- Matsuura, E., Kubota, R., Tanaka, Y., Takashima, H., and Izumo, S. (2015). Visualization of HTLV-1-specific cytotoxic T lymphocytes in the spinal cords of patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 74, 2–14.
- Matutes, E., Taylor, G.P., Cavenagh, J., Pagliuca, A., Bareford, D., Domingo, A., Hamblin, M., Kelsey, S., Mir, N., and Reilly, J.T. (2001). Interferon alpha and zidovudine therapy in adult T-cell leukaemia lymphoma: response and outcome in 15 patients. *Br. J. Haematol.* 113, 779–784.
- Mazurov, D., Ilinskaya, A., Heidecker, G., Lloyd, P., and Derse, D. (2010). Quantitative comparison of HTLV-1 and HIV-1 cell-to-cell infection with new replication dependent vectors. *PLoS Pathog.* 6, e1000788.
- Mazurov, D., Ilinskaya, A., Heidecker, G., and Filatov, A. (2012). Role of O-glycosylation and expression of CD43 and CD45 on the surfaces of effector T cells in human T cell leukemia virus type 1 cell-to-cell infection. *J. Virol.* 86, 2447–2458.

- McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., and O'Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 87–103.
- Megjugorac, N.J., Jacobs, E.S., Izaguirre, A.G., George, T.C., Gupta, G., and Fitzgerald-Bocarsly, P. (2007). Image-based study of interferogenic interactions between plasmacytoid dendritic cells and HSV-infected monocyte-derived dendritic cells. *Immunol. Invest.* 36, 739–761.
- Mehta-Shah, N., Ratner, L., and Horwitz, S.M. (2017). Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. *J Oncol Pract* 13, 487–492.
- Melamed, A., Witkover, A.D., Laydon, D.J., Brown, R., Ladell, K., Miners, K., Rowan, A.G., Gormley, N., Price, D.A., Taylor, G.P., et al. (2014). Clonality of HTLV-2 in natural infection. *PLoS Pathog.* 10, e1004006.
- Méndez, E., Kawanishi, T., Clemens, K., Siomi, H., Soldan, S.S., Calabresi, P., Brady, J., and Jacobson, S. (1997). Astrocyte-specific expression of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) Tax: induction of tumor necrosis factor alpha and susceptibility to lysis by CD8+ HTLV-1-specific cytotoxic T cells. *J. Virol.* 71, 9143–9149.
- Meyer, T.J., Rosenkrantz, J.L., Carbone, L., and Chavez, S.L. (2017). Endogenous Retroviruses: With Us and against Us. *Frontiers in Chemistry* 5.
- Meyer-Wentrup, F., Benitez-Ribas, D., Tacke, P.J., Punt, C.J.A., Figdor, C.G., de Vries, I.J.M., and Adema, G.J. (2008). Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN-alpha production. *Blood* 111, 4245–4253.
- Mitagami, Y., Yasunaga, J.-I., Kinosada, H., Ohshima, K., and Matsuoka, M. (2015). Interferon- $\gamma$  Promotes Inflammation and Development of T-Cell Lymphoma in HTLV-1 bZIP Factor Transgenic Mice. *PLoS Pathog.* 11, e1005120.
- Mori, N., Gill, P.S., Mougil, T., Murakami, S., Eto, S., and Prager, D. (1996). Interleukin-10 gene expression in adult T-cell leukemia. *Blood* 88, 1035–1045.
- Müller, U., Steinhoff, U., Reis, L.F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R.M., and Aguet, M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264, 1918–1921.
- Murphy, E.L. (2016). Infection with human T-lymphotropic virus types-1 and -2 (HTLV-1 and -2): Implications for blood transfusion safety. *Transfusion Clinique et Biologique* 23, 13–19.
- Nagai, M., Yamano, Y., Brennan, M.B., Mora, C.A., and Jacobson, S. (2001). Increased HTLV-I proviral load and preferential expansion of HTLV-I Tax-specific CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from patients with HAM/TSP. *Ann. Neurol.* 50, 807–812.
- Nakamura, S., Horie, M., Daidoji, T., Honda, T., Yasugi, M., Kuno, A., Komori, T., Okuzaki, D., Narimatsu, H., Nakaya, T., et al. (2016). Influenza A Virus-Induced Expression of a GalNAc Transferase, GALNT3, via MicroRNAs Is Required for Enhanced Viral Replication. *J. Virol.* 90, 1788–1801.
- Nakamura, T., Shibayama, K., Nagasato, K., Matsuo, H., Tsujihata, M., and Nagataki, S. (1990). The efficacy of interferon-alpha treatment in human T-lymphotropic virus type-I-associated myelopathy. *Jpn. J. Med.* 29, 362–367.
- Nakano, K., and Watanabe, T. (2016). HTLV-1 Rex Tunes the Cellular Environment Favorable for Viral Replication. *Viruses* 8, 58.
- Narulla, M.S., Alasiri, A., Charmier, L., Noonan, S., Conroy, D., Hall, W.W., and Sheehy, N. (2017). Positive and Negative Regulation of Type I Interferons by the Human T Cell Leukemia Virus Antisense Protein HBZ. *J. Virol.* 91.
- Nascimento, C.R., Lima, M.A., de Andrada Serpa, M.J., Espindola, O., Leite, A.C.C., and Echevarria-Lima, J. (2011). Monocytes from HTLV-1-infected patients are unable to fully mature into dendritic cells. *Blood* 117, 489–499.

- Nasr, R., Rosenwald, A., El-Sabban, M.E., Arnulf, B., Zalloua, P., Lepelletier, Y., Bex, F., Hermine, O., Staudt, L., de Thé, H., et al. (2003). Arsenic/interferon specifically reverses 2 distinct gene networks critical for the survival of HTLV-1-infected leukemic cells. *Blood* 101, 4576–4582.
- Navarro, F., Bollman, B., Chen, H., König, R., Yu, Q., Chiles, K., and Landau, N.R. (2005). Complementary function of the two catalytic domains of APOBEC3G. *Virology* 333, 374–386.
- Ndhlovu, L.C., Snyder-Cappione, J.E., Carvalho, K.I., Leal, F.E., Loo, C.P., Bruno, F.R., Jha, A.R., Devita, D., Hasenkrug, A.M., Barbosa, H.M.R., et al. (2009). Lower numbers of circulating Natural Killer T (NK T) cells in individuals with human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) associated neurological disease. *Clin. Exp. Immunol.* 158, 294–299.
- Ndhlovu, L.C., Leal, F.E., Hasenkrug, A.M., Jha, A.R., Carvalho, K.I., Eccles-James, I.G., Bruno, F.R., Vieira, R.G.S., York, V.A., Chew, G.M., et al. (2011). HTLV-1 tax specific CD8+ T cells express low levels of Tim-3 in HTLV-1 infection: implications for progression to neurological complications. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1030.
- Neco, H.V.P. da C., Teixeira, V.G. da S., da Trindade, A.C.L., Magalhães, P.M.R., de Lorena, V.M.B., Castellano, L.R.C., de Souza, J.R., Vasconcelos, L.R., de Moura, P.M.M.F., and de Morais, C.N.L. (2017). Mediators Go Together: High Production of CXCL9, CXCL10, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  in HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 33, 1134–1139.
- Nejmeddine, M., Barnard, A.L., Tanaka, Y., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2005). Human T-lymphotropic virus, type 1, tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. *J. Biol. Chem.* 280, 29653–29660.
- Niitsu, Y., Urushizaki, Y., Koshida, Y., Terui, K., Mahara, K., Kohgo, Y., and Urushizaki, I. (1988). Expression of TGF-beta gene in adult T cell leukemia. *Blood* 71, 263–266.
- Nishida, J., Yoshikura, H., Okabe, T., Urabe, A., and Takaku, F. (1985). Interferons inhibit syncytia-forming ability and in vitro transmission of human T-cell leukemia virus. *Jpn. J. Cancer Res.* 76, 249–252.
- Nizzoli, G., Krietsch, J., Weick, A., Steinfeldt, S., Facciotti, F., Guarin, P., Bianco, A., Steckel, B., Moro, M., Crosti, M., et al. (2013). Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood* 122, 932–942.
- O'Brien, M., Manches, O., and Bhardwaj, N. (2013). Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 762, 71–107.
- Oh, U., Yamano, Y., Mora, C.A., Ohayon, J., Bagnato, F., Butman, J.A., Dambrosia, J., Leist, T.P., McFarland, H., and Jacobson, S. (2005). Interferon-beta1a therapy in human T-lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. *Ann. Neurol.* 57, 526–534.
- Oh, U., Grant, C., Griffith, C., Fugo, K., Takenouchi, N., and Jacobson, S. (2006). Reduced Foxp3 protein expression is associated with inflammatory disease during human t lymphotropic virus type 1 infection. *J. Infect. Dis.* 193, 1557–1566.
- Ohsugi, T., and Koito, A. (2007). Human T cell leukemia virus type I is resistant to the antiviral effects of APOBEC3. *J. Virol. Methods* 139, 93–96.
- Olière, S., Hernandez, E., Lézin, A., Arguello, M., Douville, R., Nguyen, T.L.-A., Olindo, S., Panelatti, G., Kazanji, M., Wilkinson, P., et al. (2010). HTLV-1 evades type I interferon antiviral signaling by inducing the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1). *PLoS Pathog.* 6, e1001177.
- O'Neill, L.A.J., Golenbock, D., and Bowie, A.G. (2013). The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 453–460.

- Osame, M., Izumo, S., Igata, A., Matsumoto, M., Matsumoto, T., Sonoda, S., Tara, M., and Shibata, Y. (1986). Blood transfusion and HTLV-I associated myelopathy. *Lancet* 2, 104–105.
- Pais-Correia, A.-M., Sachse, M., Guadagnini, S., Robbiati, V., Lasserre, R., Gessain, A., Gout, O., Alcover, A., and Thoulouze, M.-I. (2010). Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat. Med.* 16, 83–89.
- Pashenkov, M., Huang, Y.M., Kostulas, V., Haglund, M., Söderström, M., and Link, H. (2001). Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain* 124, 480–492.
- Pedroza-Gonzalez, A., Zhou, G., Vargas-Mendez, E., Boor, P.P., Mancham, S., Verhoef, C., Polak, W.G., Grünhagen, D., Pan, Q., Janssen, H.L., et al. (2015). Tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression by Tr1 cells in human liver tumors. *Oncoimmunology* 4, e1008355.
- Pellerin, A., Otero, K., Czerkowicz, J.M., Kerns, H.M., Shapiro, R.I., Ranger, A.M., Otipoby, K.L., Taylor, F.R., Cameron, T.O., Viney, J.L., et al. (2015). Anti-BDCA2 monoclonal antibody inhibits plasmacytoid dendritic cell activation through Fc-dependent and Fc-independent mechanisms. *EMBO Mol Med* 7, 464–476.
- Pique, C., and Jones, K.S. (2012). Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Front Microbiol* 3, 378.
- Platanias, L.C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 375–386.
- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D., and Gallo, R.C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 7415–7419.
- Prince, H.E., York, J., Owen, S.M., and Lal, R.B. (1995). Spontaneous proliferation of memory (CD45RO+) and naive (CD45RO-) subsets of CD4 cells and CD8 cells in human T lymphotropic virus (HTLV) infection: distinctive patterns for HTLV-I versus HTLV-II. *Clin. Exp. Immunol.* 102, 256–261.
- Rafatpanah, H., Rezaee, A., Etemadi, M.M., Hosseini, R.F., Khorram, B., Afsahr, L., Taylor, G., Mokhber, N., Mahmoudi, M., Abbaszadegan, M.R., et al. (2012). The impact of interferon-alpha treatment on clinical and immunovirological aspects of HTLV-1-associated myelopathy in northeast of Iran. *J. Neuroimmunol.* 250, 87–93.
- Rautela, J., Baschuk, N., Slaney, C.Y., Jayatilleke, K.M., Xiao, K., Bidwell, B.N., Lucas, E.C., Hawkins, E.D., Lock, P., Wong, C.S., et al. (2015). Loss of Host Type-I IFN Signaling Accelerates Metastasis and Impairs NK-cell Antitumor Function in Multiple Models of Breast Cancer. *Cancer Immunol Res* 3, 1207–1217.
- Rehermann, B., and Nascimbeni, M. (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Immunology* 5, 215–229.
- Renzi, P., and Ginns, L.C. (1987). Analysis of T cell subsets in normal adults. *Journal of Immunological Methods* 98, 53–56.
- Richardson, J.H., Edwards, A.J., Cruickshank, J.K., Rudge, P., and Dalgleish, A.G. (1990). In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *J. Virol.* 64, 5682–5687.
- Rider, C.C., Coombe, D.R., Harrop, H.A., Hounsell, E.F., Bauer, C., Feeney, J., Mulloy, B., Mahmood, N., Hay, A., and Parish, C.R. (1994). Anti-HIV-1 activity of chemically modified heparins: correlation between binding to the V3 loop of gp120 and inhibition of cellular HIV-1 infection in vitro. *Biochemistry* 33, 6974–6980.
- Rizkallah, G., Mahieux, R., and Dutartre, H. (2015). Transmission intercellulaire de HTLV-1: Des mécanismes loin d’être complètement élucidés. *Médecine/Sciences* 31, 629–637.

- Rodrigues, E.S., do Carmo Favarin, M., de Macedo, M.D., Otaguiri, K.K., Orellana, M.D., Takayanagui, O.M., Palma, P.V.B., Slavov, S.N., Covas, D.T., and Kashima, S. (2018). Detection of HTLV-1 proviral DNA in BM mononuclear cells and cultured mesenchymal stromal cells isolated from patients with HTLV-1 infection. *Virology* 519, 145–155.
- Rosadas, C., and Puccioni-Sohler, M. (2015). HTLV-1 ORF-I Encoded Proteins and the Regulation of Host Immune Response: Viral Induced Dysregulation of Intracellular Signaling. *Journal of Immunology Research* 2015, 1–7.
- Rotger, M., Dalmau, J., Rauch, A., McLaren, P., Bosinger, S.E., Martinez, R., Sandler, N.G., Roque, A., Liebner, J., Battegay, M., et al. (2011). Comparative transcriptomics of extreme phenotypes of human HIV-1 infection and SIV infection in sooty mangabey and rhesus macaque. *J. Clin. Invest.* 121, 2391–2400.
- Royle, C.M., Graham, D.R., Sharma, S., Fuchs, D., and Boasso, A. (2014). HIV-1 and HIV-2 differentially mature plasmacytoid dendritic cells into IFN-producing cells or APCs. *J. Immunol.* 193, 3538–3548.
- Saito, M., Braud, V.M., Goon, P., Hanon, E., Taylor, G.P., Saito, A., Eiraku, N., Tanaka, Y., Usuku, K., Weber, J.N., et al. (2003). Low frequency of CD94/NKG2A+ T lymphocytes in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, but not in asymptomatic carriers. *Blood* 102, 577–584.
- Saito, M., Nakagawa, M., Kaseda, S., Matsuzaki, T., Jonosono, M., Eiraku, N., Kubota, R., Takenouchi, N., Nagai, M., Furukawa, Y., et al. (2004). Decreased human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load and alteration in T cell phenotype after interferon-alpha therapy for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J. Infect. Dis.* 189, 29–40.
- Sandler, N.G., Bosinger, S.E., Estes, J.D., Zhu, R.T.R., Tharp, G.K., Boritz, E., Levin, D., Wijeyesinghe, S., Makamdop, K.N., del Prete, G.Q., et al. (2014). Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature* 511, 601–605.
- Sasada, A., Takaori-Kondo, A., Shirakawa, K., Kobayashi, M., Abudu, A., Hishizawa, M., Imada, K., Tanaka, Y., and Uchiyama, T. (2005). APOBEC3G targets human T-cell leukemia virus type 1. *Retrovirology* 2, 32.
- Sasaki, H., Nishikata, I., Shiraga, T., Akamatsu, E., Fukami, T., Hidaka, T., Kubuki, Y., Okayama, A., Hamada, K., Okabe, H., et al. (2005). Overexpression of a cell adhesion molecule, TSLC1, as a possible molecular marker for acute-type adult T-cell leukemia. *Blood* 105, 1204–1213.
- Satake, M., Iwanaga, M., Sagara, Y., Watanabe, T., Okuma, K., and Hamaguchi, I. (2016). Incidence of human T-lymphotropic virus 1 infection in adolescent and adult blood donors in Japan: a nationwide retrospective cohort analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 16, 1246–1254.
- Sato, T., Coler-Reilly, A., Utsunomiya, A., Araya, N., Yagishita, N., Ando, H., Yamauchi, J., Inoue, E., Ueno, T., Hasegawa, Y., et al. (2013). CSF CXCL10, CXCL9, and neopterin as candidate prognostic biomarkers for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2479.
- Satou, Y., Yasunaga, J., Yoshida, M., and Matsuoka, M. (2006). HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 720–725.
- Satou, Y., Utsunomiya, A., Tanabe, J., Nakagawa, M., Nosaka, K., and Matsuoka, M. (2012). HTLV-1 modulates the frequency and phenotype of FoxP3+CD4+ T cells in virus-infected individuals. *Retrovirology* 9, 46.

- Sawada, L., Nagano, Y., Hasegawa, A., Kanai, H., Nogami, K., Ito, S., Sato, T., Yamano, Y., Tanaka, Y., Masuda, T., et al. (2017). IL-10-mediated signals act as a switch for lymphoproliferation in Human T-cell leukemia virus type-1 infection by activating the STAT3 and IRF4 pathways. *PLoS Pathog.* 13, e1006597.
- Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., and Rice, C.M. (2014). Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 513–545.
- Schroeder, J.T., Bieneman, A.P., Xiao, H., Chichester, K.L., Vasagar, K., Saini, S., and Liu, M.C. (2005). TLR9- and FcepsilonRI-mediated responses oppose one another in plasmacytoid dendritic cells by down-regulating receptor expression. *J. Immunol.* 175, 5724–5731.
- Schwartz, J.A., Clayton, K.L., Mujib, S., Zhang, H., Rahman, A.K.M.N.-U., Liu, J., Yue, F.Y., Benko, E., Kovacs, C., and Ostrowski, M.A. (2017). Tim-3 is a Marker of Plasmacytoid Dendritic Cell Dysfunction during HIV Infection and Is Associated with the Recruitment of IRF7 and p85 into Lysosomes and with the Submembrane Displacement of TLR9. *J. Immunol.* 198, 3181–3194.
- See, P., Dutertre, C.-A., Chen, J., Günther, P., McGovern, N., Irac, S.E., Gunawan, M., Beyer, M., Händler, K., Duan, K., et al. (2017). Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science* 356.
- Shibayama, K., Nakamura, T., Nagasato, K., Shirabe, S., Tsujihata, M., and Nagataki, S. (1991). Interferon-alpha treatment in HTLV-I-associated myelopathy. Studies of clinical and immunological aspects. *J. Neurol. Sci.* 106, 186–192.
- Shimauchi, T., Kabashima, K., Nakashima, D., Sugita, K., Yamada, Y., Hino, R., and Tokura, Y. (2007). Augmented expression of programmed death-1 in both neoplastic and non-neoplastic CD4+ T-cells in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int. J. Cancer* 121, 2585–2590.
- Shimotohno, K., Takahashi, Y., Shimizu, N., Gojobori, T., Golde, D.W., Chen, I.S., Miwa, M., and Sugimura, T. (1985). Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 3101–3105.
- Shimoyama, M. (1991). Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br. J. Haematol.* 79, 428–437.
- Shinagawa, M., Jinno-Oue, A., Shimizu, N., Roy, B.B., Shimizu, A., Hoque, S.A., and Hoshino, H. (2012). Human T-cell leukemia viruses are highly unstable over a wide range of temperatures. *J. Gen. Virol.* 93, 608–617.
- Sindrewicz, P., Lian, L.-Y., and Yu, L.-G. (2016). Interaction of the Oncofetal Thomsen-Friedenreich Antigen with Galectins in Cancer Progression and Metastasis. *Front Oncol* 6, 79.
- Sisirak, V., Faget, J., Gobert, M., Goutagny, N., Vey, N., Treilleux, I., Renaudineau, S., Poyet, G., Labidi-Galy, S.I., Goddard-Leon, S., et al. (2012). Impaired IFN- $\alpha$  production by plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T-cell expansion that may contribute to breast cancer progression. *Cancer Res.* 72, 5188–5197.
- Sisirak, V., Vey, N., Goutagny, N., Renaudineau, S., Malfroy, M., Thys, S., Treilleux, I., Labidi-Galy, S.I., Bachelot, T., Dezutter-Dambuyant, C., et al. (2013). Breast cancer-derived transforming growth factor- $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  compromise interferon- $\alpha$  production by tumor-associated plasmacytoid dendritic cells. *Int. J. Cancer* 133, 771–778.
- Smit, J.J., Rudd, B.D., and Lukacs, N.W. (2006). Plasmacytoid dendritic cells inhibit pulmonary immunopathology and promote clearance of respiratory syncytial virus. *J. Exp. Med.* 203, 1153–1159.

- Smith, D., Buckle, G.J., Hafler, D.A., Frank, D.A., and Höllsberg, P. (1999). HTLV-I-infected T cells evade the antiproliferative action of IFN-beta. *Virology* 257, 314–321.
- Snell, L.M., and Brooks, D.G. (2015). New insights into type I interferon and the immunopathogenesis of persistent viral infections. *Curr. Opin. Immunol.* 34, 91–98.
- Snell, L.M., McGaha, T.L., and Brooks, D.G. (2017). Type I Interferon in Chronic Virus Infection and Cancer. *Trends Immunol.* 38, 542–557.
- Sozzani, S., Vermi, W., Del Prete, A., and Facchetti, F. (2010). Trafficking properties of plasmacytoid dendritic cells in health and disease. *Trends Immunol.* 31, 270–277.
- Starling, A.L.B., Martins-Filho, O.A., Lambertucci, J.R., Labanca, L., de Souza Pereira, S.R., Teixeira-Carvalho, A., Martins, M.L., Ribas, J.G., Carneiro-Proietti, A.B.F., and Gonçalves, D.U. (2013). Proviral load and the balance of serum cytokines in HTLV-1-asymptomatic infection and in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Acta Trop.* 125, 75–81.
- Stinissen, P., Vandevyver, C., Medaer, R., Vandegaer, L., Nies, J., Tuyls, L., Hafler, D.A., Raus, J., and Zhang, J. (1995). Increased frequency of gamma delta T cells in cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with multiple sclerosis. Reactivity, cytotoxicity, and T cell receptor V gene rearrangements. *J. Immunol.* 154, 4883–4894.
- Sukriti, S., Trehanpati, N., Kumar, M., Pande, C., Hissar, S.S., and Sarin, S.K. (2016). Functionally aberrant dendritic cell subsets and expression of DC-SIGN differentiate acute from chronic HBV infection. *Hepatol Int* 10, 916–923.
- Sun, G., Yang, S., Cao, G., Wang, Q., Hao, J., Wen, Q., Li, Z., So, K.-F., Liu, Z., Zhou, S., et al. (2018).  $\gamma\delta$  T cells provide the early source of IFN- $\gamma$  to aggravate lesions in spinal cord injury. *J. Exp. Med.* 215, 521–535.
- Suzuki, S., Zhou, Y., Refaat, A., Takasaki, I., Koizumi, K., Yamaoka, S., Tabuchi, Y., Saiki, I., and Sakurai, H. (2010). Human T cell lymphotropic virus 1 manipulates interferon regulatory signals by controlling the TAK1-IRF3 and IRF4 pathways. *J. Biol. Chem.* 285, 4441–4446.
- Suzuki, S., Masaki, A., Ishida, T., Ito, A., Mori, F., Sato, F., Narita, T., Ri, M., Kusumoto, S., Komatsu, H., et al. (2012). Tax is a potential molecular target for immunotherapy of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Sci.* 103, 1764–1773.
- Swiecki, M., and Colonna, M. (2015). The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 471–485.
- Swiecki, M., Gilfillan, S., Vermi, W., Wang, Y., and Colonna, M. (2010). Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral NK and CD8(+) T cell accrual. *Immunity* 33, 955–966.
- Swiecki, M., Wang, Y., Gilfillan, S., and Colonna, M. (2013). Plasmacytoid dendritic cells contribute to systemic but not local antiviral responses to HSV infections. *PLoS Pathog.* 9, e1003728.
- Sze, A., Belgnaoui, S.M., Olagnier, D., Lin, R., Hiscott, J., and van Grevenynghe, J. (2013). Host Restriction Factor SAMHD1 Limits Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Infection of Monocytes via STING-Mediated Apoptosis. *Cell Host & Microbe* 14, 422–434.
- Szymocha, R., Brisson, C., Bernard, A., Akaoka, H., Belin, M.F., and Giraudon, P. (2000). Long-term effects of HTLV-1 on brain astrocytes: sustained expression of Tax-1 associated with synthesis of inflammatory mediators. *J. Neurovirol.* 6, 350–357.
- Takeda, S., Maeda, M., Morikawa, S., Taniguchi, Y., Yasunaga, J., Nosaka, K., Tanaka, Y., and Matsuoka, M. (2004). Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *International Journal of Cancer* 109, 559–567.
- Tamul, K.R., O’Gorman, M.R., Donovan, M., Schmitz, J.L., and Folds, J.D. (1994). Comparison of a lysed whole blood method to purified cell preparations for lymphocyte



- immunophenotyping: differences between healthy controls and HIV-positive specimens. *J. Immunol. Methods* 167, 237–243.
- Tan, G., Song, H., Xu, F., and Cheng, G. (2018). When Hepatitis B Virus Meets Interferons. *Front Microbiol* 9, 1611.
- Tanaka, A., Takahashi, C., Yamaoka, S., Nosaka, T., Maki, M., and Hatanaka, M. (1990). Oncogenic transformation by the tax gene of human T-cell leukemia virus type I in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 1071–1075.
- Tanaka, M., Sun, B., Tezuka, K., Fujisawa, J.-I., Tanaka, Y., Hoshino, H., and Miwa, M. (2010). Neuraminidase enhances the initial steps of human T-cell leukemia virus type 1 replication. *Microbes Infect.* 12, 119–125.
- Tanaka, Y., Fukudome, K., Hayashi, M., Takagi, S., and Yoshie, O. (1995). Induction of ICAM-1 and LFA-3 by Tax1 of human T-cell leukemia virus type 1 and mechanism of down-regulation of ICAM-1 or LFA-1 in adult-T-cell-leukemia cell lines. *Int. J. Cancer* 60, 554–561.
- Tarsis, S.L., Yu, M.T., Parks, E.S., Persaud, D., Muñoz, J.L., and Parks, W.P. (1998). Human T-lymphocyte transformation with human T-cell lymphotropic virus type 2. *J. Virol.* 72, 841–846.
- Tattermusch, S., Skinner, J.A., Chaussabel, D., Banchereau, J., Berry, M.P., McNab, F.W., O’Garra, A., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2012). Systems biology approaches reveal a specific interferon-inducible signature in HTLV-1 associated myelopathy. *PLoS Pathog.* 8, e1002480.
- Taylor, G.P., Goon, P., Furukawa, Y., Green, H., Barfield, A., Mosley, A., Nose, H., Babiker, A., Rudge, P., Usuku, K., et al. (2006). Zidovudine plus lamivudine in Human T-Lymphotropic Virus type-I-associated myelopathy: a randomised trial. *Retrovirology* 3, 63.
- Teijaro, J.R., Ng, C., Lee, A.M., Sullivan, B.M., Sheehan, K.C.F., Welch, M., Schreiber, R.D., de la Torre, J.C., and Oldstone, M.B.A. (2013). Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science* 340, 207–211.
- Tendler, C.L., Greenberg, S.J., Burton, J.D., Danielpour, D., Kim, S.J., Blattner, W.A., Manns, A., and Waldmann, T.A. (1991). Cytokine induction in HTLV-I associated myelopathy and adult T-cell leukemia: alternate molecular mechanisms underlying retroviral pathogenesis. *J. Cell. Biochem.* 46, 302–311.
- Termini, J.M., Church, E.S., Silver, Z.A., Haslam, S.M., Dell, A., and Desrosiers, R.C. (2017). Human Immunodeficiency Virus and Simian Immunodeficiency Virus Maintain High Levels of Infectivity in the Complete Absence of Mucin-Type O-Glycosylation. *J. Virol.* 91.
- Tomasello, E., Pollet, E., Vu Manh, T.-P., Uzé, G., and Dalod, M. (2014). Harnessing Mechanistic Knowledge on Beneficial Versus Deleterious IFN-I Effects to Design Innovative Immunotherapies Targeting Cytokine Activity to Specific Cell Types. *Front Immunol* 5, 526.
- Toulza, F., Nosaka, K., Takiguchi, M., Pagliuca, T., Mitsuya, H., Tanaka, Y., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2009). FoxP3+ regulatory T cells are distinct from leukemia cells in HTLV-1-associated adult T-cell leukemia. *Int. J. Cancer* 125, 2375–2382.
- Treilleux, I., Blay, J.-Y., Bendriss-Vermare, N., Ray-Coquard, I., Bachelot, T., Guastalla, J.-P., Bremond, A., Goddard, S., Pin, J.-J., Barthelemy-Dubois, C., et al. (2004). Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 10, 7466–7474.
- Tsukasaki, K., Utsunomiya, A., Fukuda, H., Shibata, T., Fukushima, T., Takatsuka, Y., Ikeda, S., Masuda, M., Nagoshi, H., Ueda, R., et al. (2007). VCAP-AMP-VECP compared

- with biweekly CHOP for adult T-cell leukemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG9801. *J. Clin. Oncol.* 25, 5458–5464.
- Uchiyama, T., Yodoi, J., Sagawa, K., Takatsuki, K., and Uchino, H. (1977). Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* 50, 481–492.
- Umehara, F., Izumo, S., Nakagawa, M., Ronquillo, A.T., Takahashi, K., Matsumuro, K., Sato, E., and Osame, M. (1993). Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 52, 424–430.
- Uzé, G., Di Marco, S., Mouchel-Vielh, E., Monneron, D., Bandu, M.T., Horisberger, M.A., Dorques, A., Lutfalla, G., and Mogensen, K.E. (1994). Domains of interaction between alpha interferon and its receptor components. *J. Mol. Biol.* 243, 245–257.
- Van Prooyen, N., Gold, H., Andresen, V., Schwartz, O., Jones, K., Ruscelli, F., Lockett, S., Gudla, P., Venzon, D., and Franchini, G. (2010). Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 20738–20743.
- Vance, R.E. (2016). Cytosolic DNA Sensing: The Field Narrows. *Immunity* 45, 227–228.
- Vandamme, A.M., Salemi, M., and Desmyter, J. (1998). The simian origins of the pathogenic human T-cell lymphotropic virus type I. *Trends Microbiol.* 6, 477–483.
- Vander Kooi, C.W., Jusino, M.A., Perman, B., Neau, D.B., Bellamy, H.D., and Leahy, D.J. (2007). Structural basis for ligand and heparin binding to neuropilin B domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 6152–6157.
- Vasiliver-Shamis, G., Dustin, M.L., and Hioe, C.E. (2010). HIV-1 Virological Synapse is not Simply a Copycat of the Immunological Synapse. *Viruses* 2, 1239–1260.
- Verdonck, K., González, E., Van Dooren, S., Vandamme, A.-M., Vanham, G., and Gotuzzo, E. (2007). Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *The Lancet Infectious Diseases* 7, 266–281.
- Villadangos, J.A., and Young, L. (2008). Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 29, 352–361.
- Virgin, H.W., Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2009). Redefining Chronic Viral Infection. *Cell* 138, 30–50.
- Vrieling, H., and Reesink, H.W. (2004). HTLV-I/II prevalence in different geographic locations. *Transfus Med Rev* 18, 46–57.
- Walker, S.J., Pizzato, M., Takeuchi, Y., and Devereux, S. (2002). Heparin binds to murine leukemia virus and inhibits Env-independent attachment and infection. *J. Virol.* 76, 6909–6918.
- Wang, H., Peters, N., and Schwarze, J. (2006). Plasmacytoid dendritic cells limit viral replication, pulmonary inflammation, and airway hyperresponsiveness in respiratory syncytial virus infection. *J. Immunol.* 177, 6263–6270.
- Wang, J., Yang, S., Liu, L., Wang, H., and Yang, B. (2017a). HTLV-1 Tax impairs K63-linked ubiquitination of STING to evade host innate immunity. *Virus Res.* 232, 13–21.
- Wang, J., Kang, L., Song, D., Liu, L., Yang, S., Ma, L., Guo, Z., Ding, H., Wang, H., and Yang, B. (2017b). Ku70 Senses HTLV-1 DNA and Modulates HTLV-1 Replication. *J. Immunol.* 199, 2475–2482.
- Wang, Y., Swiecki, M., Cella, M., Alber, G., Schreiber, R.D., Gilfillan, S., and Colonna, M. (2012). Timing and magnitude of type I interferon responses by distinct sensors impact CD8 T cell exhaustion and chronic viral infection. *Cell Host Microbe* 11, 631–642.
- Watanabe, T. (2017). Adult T-cell leukemia: molecular basis for clonal expansion and transformation of HTLV-1-infected T cells. *Blood* 129, 1071–1081.

- Wattel, E., Vartanian, J.P., Pannetier, C., and Wain-Hobson, S. (1995). Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *J. Virol.* 69, 2863–2868.
- Webster, B., Assil, S., and Dreux, M. (2016). Cell-Cell Sensing of Viral Infection by Plasmacytoid Dendritic Cells. *J. Virol.* 90, 10050–10053.
- Webster, B., Werneke, S.W., Zafirova, B., This, S., Coléon, S., Décembre, E., Paidassi, H., Bouvier, I., Joubert, P.-E., Duffy, D., et al. (2018). Plasmacytoid dendritic cells control dengue and Chikungunya virus infections via IRF7-regulated interferon responses. *Elife* 7.
- Wherry, E.J., and Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews Immunology* 15, 486–499.
- Wieland, S.F., Takahashi, K., Boyd, B., Whitten-Bauer, C., Ngo, N., de la Torre, J.-C., and Chisari, F.V. (2014). Human plasmacytoid dendritic cells sense lymphocytic choriomeningitis virus-infected cells in vitro. *J. Virol.* 88, 752–757.
- Wilkins, C., and Gale, M. (2010). Recognition of viruses by cytoplasmic sensors. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 41–47.
- Wilson, E.B., Yamada, D.H., Elsaesser, H., Herskovitz, J., Deng, J., Cheng, G., Aronow, B.J., Karp, C.L., and Brooks, D.G. (2013). Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science* 340, 202–207.
- Wolf, A.I., Buehler, D., Hensley, S.E., Cavanagh, L.L., Wherry, E.J., Kastner, P., Chan, S., and Wenginger, W. (2009). Plasmacytoid dendritic cells are dispensable during primary influenza virus infection. *J. Immunol.* 182, 871–879.
- Woltman, A.M., Op den Brouw, M.L., Biesta, P.J., Shi, C.C., and Janssen, H.L.A. (2011). Hepatitis B virus lacks immune activating capacity, but actively inhibits plasmacytoid dendritic cell function. *PLoS ONE* 6, e15324.
- Wu, X.M., Osoegawa, M., Yamasaki, K., Kawano, Y., Ochi, H., Horiuchi, I., Minohara, M., Ohyagi, Y., Yamada, T., and Kira, J.I. (2000). Flow cytometric differentiation of Asian and Western types of multiple sclerosis, HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) and hyperIgEaemic myelitis by analyses of memory CD4 positive T cell subsets and NK cell subsets. *J. Neurol. Sci.* 177, 24–31.
- Xu, Y., Hu, Y., Shi, B., Zhang, X., Wang, J., Zhang, Z., Shen, F., Zhang, Q., Sun, S., and Yuan, Z. (2009). HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN- $\alpha$  production in plasmacytoid dendritic cells. *Mol. Immunol.* 46, 2640–2646.
- Yamano, Y., and Coler-Reilly, A. (2017). HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells that produces an inflammatory positive feedback loop via astrocytes in HAM/TSP. *J. Neuroimmunol.* 304, 51–55.
- Yamano, Y., Takenouchi, N., Li, H.-C., Tomaru, U., Yao, K., Grant, C.W., Maric, D.A., and Jacobson, S. (2005). Virus-induced dysfunction of CD4+CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease. *J. Clin. Invest.* 115, 1361–1368.
- Yamano, Y., Araya, N., Sato, T., Utsunomiya, A., Azakami, K., Hasegawa, D., Izumi, T., Fujita, H., Aratani, S., Yagishita, N., et al. (2009). Abnormally high levels of virus-infected IFN- $\gamma$ + CCR4+ CD4+ CD25+ T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder. *PLoS ONE* 4, e517.
- Yamasaki, K., Kira, J., Koyanagi, Y., Kawano, Y., Miyano-Kurosaki, N., Nakamura, M., Baba, E., Suzuki, J., Yamamoto, A., Yamamoto, N., et al. (1997). Long-term, high dose interferon- $\alpha$  treatment in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: a combined clinical, virological and immunological study. *J. Neurol. Sci.* 147, 135–144.
- Yamauchi, J., Coler-Reilly, A., Sato, T., Araya, N., Yagishita, N., Ando, H., Kunitomo, Y., Takahashi, K., Tanaka, Y., Shibagaki, Y., et al. (2015). Mogamulizumab, an anti-CCR4

- antibody, targets human T-lymphotropic virus type 1-infected CD8+ and CD4+ T cells to treat associated myelopathy. *J. Infect. Dis.* 211, 238–248.
- Yang, B., Song, D., Liu, Y., Cui, Y., Lu, G., Di, W., Xing, H., Ma, L., Guo, Z., Guan, Y., et al. (2018). IFI16 regulates HTLV-1 replication through promoting HTLV-1 RTI-induced innate immune responses. *FEBS Lett.* 592, 1693–1704.
- Yang, L., Pang, Y., and Moses, H.L. (2010). TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* 31, 220–227.
- Yasukawa, M., Inatsuki, A., Yakushijin, Y., and Kobayashi, Y. (1992). Human T-cell leukemia virus type I(HTLV-I) infection of T cells bearing T-cell receptor gamma delta: effects of HTLV-I infection on cytotoxicity. *Int. J. Cancer* 50, 431–437.
- Yasuma, K., Yasunaga, J., Takemoto, K., Sugata, K., Mitobe, Y., Takenouchi, N., Nakagawa, M., Suzuki, Y., and Matsuoka, M. (2016). HTLV-1 bZIP Factor Impairs Anti-viral Immunity by Inducing Co-inhibitory Molecule, T Cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT). *PLoS Pathog.* 12, e1005372.
- Yasunaga Ji, null, Sakai, T., Nosaka, K., Etoh Ki, null, Tamiya, S., Koga, S., Mita, S., Uchino, M., Mitsuya, H., and Matsuoka, M. (2001). Impaired production of naive T lymphocytes in human T-cell leukemia virus type I-infected individuals: its implications in the immunodeficient state. *Blood* 97, 3177–3183.
- Yoshida, M., Miyoshi, I., and Hinuma, Y. (1982). Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 2031–2035.
- Yoshie, O., Fujisawa, R., Nakayama, T., Harasawa, H., Tago, H., Izawa, D., Hieshima, K., Tatsumi, Y., Matsushima, K., Hasegawa, H., et al. (2002). Frequent expression of CCR4 in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1-transformed T cells. *Blood* 99, 1505–1511.
- Yuen, C.-K., Chan, C.-P., Fung, S.-Y., Wang, P.-H., Wong, W.-M., Tang, H.-M.V., Yuen, K.-S., Chan, C.-P., Jin, D.-Y., and Kok, K.-H. (2016). Suppression of Type I Interferon Production by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Oncoprotein Tax through Inhibition of IRF3 Phosphorylation. *J. Virol.* 90, 3902–3912.
- Zaritsky, L.A., Bedsaul, J.R., and Zoon, K.C. (2015). Virus Multiplicity of Infection Affects Type I Interferon Subtype Induction Profiles and Interferon-Stimulated Genes. *J. Virol.* 89, 11534–11548.
- Zevini, A., Olganier, D., and Hiscott, J. (2017). Crosstalk between Cytoplasmic RIG-I and STING Sensing Pathways. *Trends Immunol.* 38, 194–205.
- Zhang, J., Yamada, O., Kawagishi, K., Araki, H., Yamaoka, S., Hattori, T., and Shimotohno, K. (2008). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax modulates interferon-alpha signal transduction through competitive usage of the coactivator CBP/p300. *Virology* 379, 306–313.
- Zuniga, E.I., Macal, M., Lewis, G.M., and Harker, J.A. (2015). Innate and Adaptive Immune Regulation During Chronic Viral Infections. *Annual Review of Virology* 2, 573–597.
- (2010).



# **ANNEXES**

## **Annexe 1**

### **Dendritic cell maturation, but not type I interferon exposure, restricts infection by HTLV-1, and viral transmission to T-cells**

Rizkallah, G., Alais, S., Futsch, N., Tanaka, Y., Journo, C., Mahieux, R., and Dutartre, H.

**2017** PLoS Pathog. 13, e1006494

## **Annexe 2**

### **HTLV-1, the Other Pathogenic Yet Neglected Human Retrovirus: From Transmission to Therapeutic Treatment**

Futsch, N., Mahieux, R., and Dutartre, H.

**2017** Viruses 10, 1.

## **Annexe 3**

### **HTLV-1 et cellules dendritiques : une relation en quête de maturation**

Futsch, N., Mahieux, R., and Dutartre, H.

**2018** Med Sci (Paris) 34, 117–120.

RESEARCH ARTICLE

# Dendritic cell maturation, but not type I interferon exposure, restricts infection by HTLV-1, and viral transmission to T-cells

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

**1** International Center for Research in Infectiology, Retroviral Oncogenesis laboratory, INSERM U1111 – Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon, Lyon, France, **2** Equipe labellisée “Ligue Nationale Contre le Cancer”, Lyon, France, **3** Department of Immunology, Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus, Uehara 207, Nishihara-cho, Okinawa, Japan

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



 OPEN ACCESS

**Citation:** Rizkallah G, Alais S, Futsch N, Tanaka Y, Journo C, Mahieux R, et al. (2017) Dendritic cell maturation, but not type I interferon exposure, restricts infection by HTLV-1, and viral transmission to T-cells. *PLoS Pathog* 13(4): e1006353. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006353>

**Editor:** Ronald C. Desrosiers, Miller School of Medicine, UNITED STATES

**Received:** December 22, 2016

**Accepted:** April 13, 2017

**Published:** April 20, 2017

**Copyright:** © 2017 Rizkallah et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by the “Ligue Nationale contre le Cancer, équipe labellisée program” EL2013-3 Mahieux to HD, RM and CJ. GR is funded by a joint funding program from the Lebanese National Council for Scientific Research CNRS-L and the Université Saint-Joseph USJ (Lebanon) and by a PhD grant from Fondation

## Abstract

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

## Author summary

Human T-Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1) is the etiological agent of Adult T-cell Leukemia/Lymphoma (ATLL) and HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). In chronically infected patients, the provirus is mainly detected



Merieux (France). HD and SA are funded by INSERM, CJ and RM are funded by the ENS de Lyon. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing of interests exist.

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

## Introduction

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

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

In addition to the blood, DCs are widely distributed in peripheral tissues and in mucosae, where antigen capture might occur. DCs play a central role in activating naïve T-cells and directing the subsequent immune response. DCs are constituted of several distinct subsets that differ in their ability to activate immunity or to promote tolerance [16]. Since HTLV-1 is transmitted through contact with infected cells present in maternal milk, semen or blood, viruses may first be in contact with different DC subsets present in these different tissues. The interaction of HTLV-1-infected cells with a given DC subset may thus affect the subsequent immune response. In addition, interaction with distinct DC subsets might have an impact on the risk of

developing ATLL in the case of mother-to-child transmission or on the risk of developing HAM/TSP in the case of infection with contaminated blood [17,18].

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

## Material and methods

### Ethics statement

The French Comité de protection des personnes Ile de France has approved the use of human samples used in this study. CPP-IDF-2012-10-04SC to Dr. Gessain (Institut Pasteur, France).

### Reagents and antibodies

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

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

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

### Cells

Jurkat cells stably transfected with a plasmid encoding the luciferase (Luc) gene under the control of the HTLV-1 long terminal repeat (LTR) promoter (Jurkat-LTR-Luc) [21] were maintained under hygromycin (450  $\mu$ g/ml, Sigma) selection in RPMI 1640 medium supplemented

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

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

Blood was collected by Etablissement Français du Sang (Lyon, France) from non-infected blood donors. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinized blood on Ficoll density gradient. Monocytes were purified from PBMCs on Percoll gradients. Cells were cryopreserved in 10% dimethylsulfoxide (DMSO) - 50% FCS—40% culture medium before being used. Dendritic cells were generated after culture of monocytes in complete MDDC medium. IL-4 DCs were obtained after culture of monocytes in complete MDDC medium supplemented with GM-CSF and IL-4 for 5 days. Fresh cytokines were added 72 h later. When indicated, IL-4 DCs were further treated for 18 h by the addition of TLR agonists or recombinant IFN-α in the MDDC medium. TGF-β DCs were obtained after culture of monocytes in complete MDDC medium supplemented with GM-CSF, IL-4 and TGF-β for 5 days. Fresh cytokines were added 72 h later. IFN-α DCs were obtained from monocytes cultured in complete MDDC medium supplemented with GM-CSF and IFN-α for 3 days. Fresh cytokines were added 24 h later.

### MDDC infection

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

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

### HTLV-1 capture assay

MDDCs ( $2.5 \times 10^5$  cells) were plated in 48-well plates and treated with drugs targeting several endocytosis pathways for 3 h. Untreated cells were incubated in the same conditions and were used as controls. Treated and control MDDCs were then co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells ( $2.5 \times 10^4$  cells) for an additional 3 h. Cells were then fixed and stained for flow cytometry analyses.

### Immunofluorescence and confocal microscopy

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

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

MDDCs were plated in Lab-Tek wells and incubated with the lysotracker Red DND-99 (5  $\mu\text{M}$ , Thermofisher scientific, L7528) for 30 minutes. Cells were then extensively washed and fixed in 4% PFA. For lipid droplets staining, cells were fixed in 4% PFA, and stained with Nile Red (0.25 mg/ml; Sigma) for 15 min. After several washes in PBS and lastly in water, slides were mounted in Dapi-Fluoromount G and fluorescence analyzed with routine inverted Zeiss axiovert 135 microscope. Fluorescent signals were quantified with ImageJ.

### Flow cytometry

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

To analyze productive infection, MDDCs were collected after co-culture with C91-PL, washed in PBS and in normal goat serum (7%, Sigma), fixed and permeabilized according to the manufacturer's instructions (eBiosciences). Cells were stained with biotin-coupled anti-Tax antibody (LT4) followed by streptavidin labeled with PE-Cy7 (BioLegend, Ozyme). After extensive washes, cells were finally surface-stained with a V450-coupled anti-CD11c antibody. All results were acquired by flow cytometry using at least 50 000 events (FACSCantoII; BD-Biosciences) and analyzed with FlowJo software.

### Genomic DNA extraction and real-time PCR

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

### RNA extraction and RT-PCR

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

### Viral transfer to T-cells

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

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

### Quantification of cell-cell contacts

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

## Type I interferon quantification

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

## Statistics and representation of data

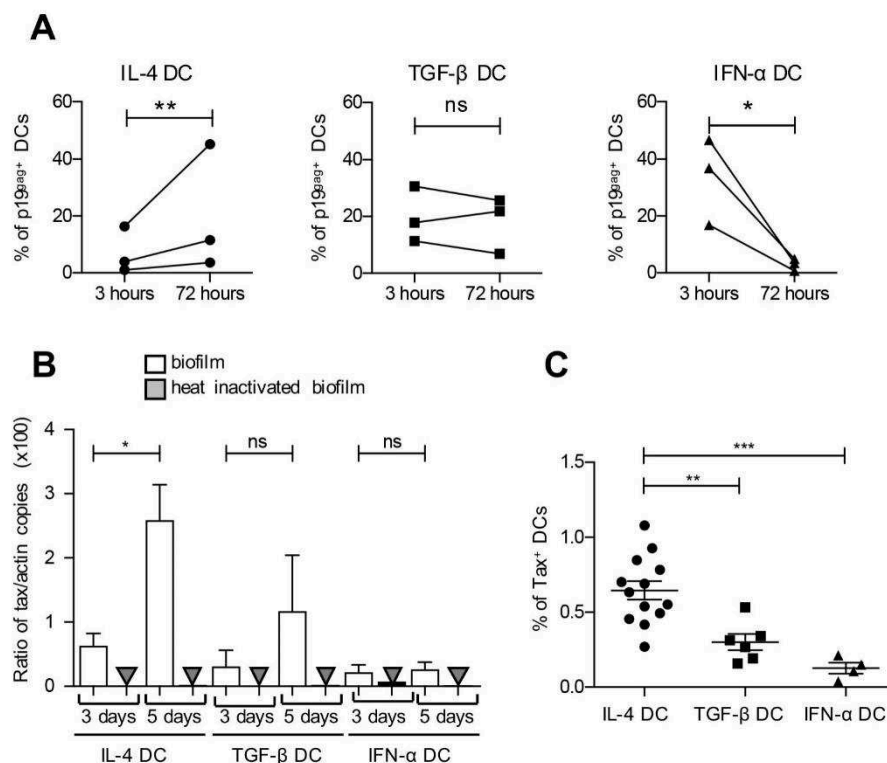
One-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's post-hoc multiple comparison test was used to determine statistically significant differences. Paired two-tail t-test was used to compare two groups from the same donor. Differences were considered significant if the p-value was  $< 0.05$ .

## Results

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

To determine whether all DC subsets were equally susceptible to HTLV-1, IL-4 DCs, TGF- $\beta$  DCs and IFN- $\alpha$  DCs were generated from human primary monocytes. DC differentiation was controlled by the loss of CD14 expression and the acquisition of CD11c expression (S1A Fig). Consistent with previous data [19], IL-4 DCs and TGF- $\beta$  DCs displayed the most immature phenotype, with a low surface expression of CD86, CD40 and HLA-DR markers (S1A Fig). Expression of these maturation markers was increased in IFN- $\alpha$  DCs confirming their more mature phenotype (S1A Fig). The three different DC subtypes were then exposed to infected C91-PL cells. Infection was first monitored by the accumulation of the structural p19<sup>gag</sup> viral protein over time (Fig 1A). In IL-4 DCs, the relative abundance of p19<sup>gag</sup>-positive cells significantly increased between 3h and 72 h post infection (p.i.), while it significantly decreased in IFN- $\alpha$  DCs, suggesting that IFN- $\alpha$  DC are not productively infected. Of note, in TGF- $\beta$  DCs, the amount of p19<sup>gag</sup>-positive cells did not change significantly, suggesting a reduced level of infection. To confirm this result, the amount of proviral DNA was quantified 3 and 5 days after contact of the different DCs with purified HTLV-1 viral biofilm (Fig 1B). Viral biofilm are membrane-bound viruses that are embedded in extracellular matrix-rich structures at the surface of infected cells [21]. Infection with purified viral biofilm allows quantification of viral DNA resulting from *de novo* infection of target cells, without contamination with viral DNA from C91-PL that occurs when infection is performed through co-culture with infected cells. As previously shown [9], proviral DNA was detected in IL-4 DCs exposed to viral biofilm, and its amount significantly increased during the course of infection (Fig 1B). Proviral DNA was also detected in TGF- $\beta$  DCs exposed to viral biofilm but, consistent with the low accumulation of viral p19<sup>gag</sup>, its amount did not significantly increase during the course of exposure (Fig 1B), suggesting that TGF- $\beta$  DCs are less susceptible than IL-4 DCs to HTLV-1 infection. In contrast, HTLV-1 viral DNA was barely detected in IFN- $\alpha$  DCs exposed to viral biofilm and its amount did not change during the course of infection (Fig 1B). As a control, no viral DNA was detected when heat-inactivated viral biofilm was used (Fig 1B).

Productive infection was further confirmed by detection of Tax expression, since this viral protein is absent from the viral particle. Consistent with the amount of viral DNA, a higher percentage of IL-4 DCs expressed Tax compared to TGF- $\beta$  DCs, with a mean of 0,6% infected cells (Fig 1C). A significant reduction in the number of Tax-expressing cells was observed among IL-4 DCs when infection was performed in the presence of AZT (S1B Fig), confirming that Tax expression results from productive infection [9]. In addition, a very low percentage of



**Fig 1. IL-4 DCs, TGF-β DCs and IFN-α DCs are not equally susceptible to HTLV-1 infection.** (A) MDDCs were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells, and the percentage of MDDCs expressing the viral p19<sup>agg</sup> protein was assessed by flow cytometry after 3 h to measure viral capture or 72 h to measure *de novo* viral expression by productively infected MDDCs. MDDCs were discriminated from C91-PL cells by CD11c gating. The results obtained from MDDCs differentiated from the same blood donor are shown as percentage of p19<sup>agg</sup> protein present in DCs during the time course. Results for 3 independent experiments performed on different donors are shown. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using a paired t-test: \*\*p<0.01; \*p<0.05; ns: non significant. (B) MDDCs were exposed to purified viral biofilm or heat-inactivated biofilm. Genomic DNA was extracted 3 days or 5 days post-exposure and analyzed by real-time PCR. Results are presented as the ratio of *tax/actin* obtained from 3 independent experiments performed on different donors. Mean values are indicated. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using a t-test: \*p<0.05; ns: non significant. (C) MDDCs were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 days and the percentage of MDDCs expressing the viral Tax protein determined by flow cytometry. The mean value of at least 4 independent experiments obtained with different blood donors is indicated. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test: \*\*\*p<0,001; \*\*p<0.01.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006353.g001>

Tax-expressing cells were found in the IFN-α DC population (Fig 1C) with a mean of 0,1% infected cells. Altogether, these results demonstrate that the IL-4 DC population is more susceptible to HTLV-1 infection than the TGF-β one, and that the IFN-α DC population is resistant to HTLV-1 infection.

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

To understand the mechanism leading to differential susceptibility to HTLV-1 infection in the three DC subsets, we first controlled the expression of HTLV-1 (Fig 2). Two proteins, the binding receptor NRP-1 and the fusion receptor Glut-1, have been involved in HTLV-1 entry in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes [25]. In addition, DC-SIGN is involved in HTLV-1 binding to DCs [7]

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

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

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

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

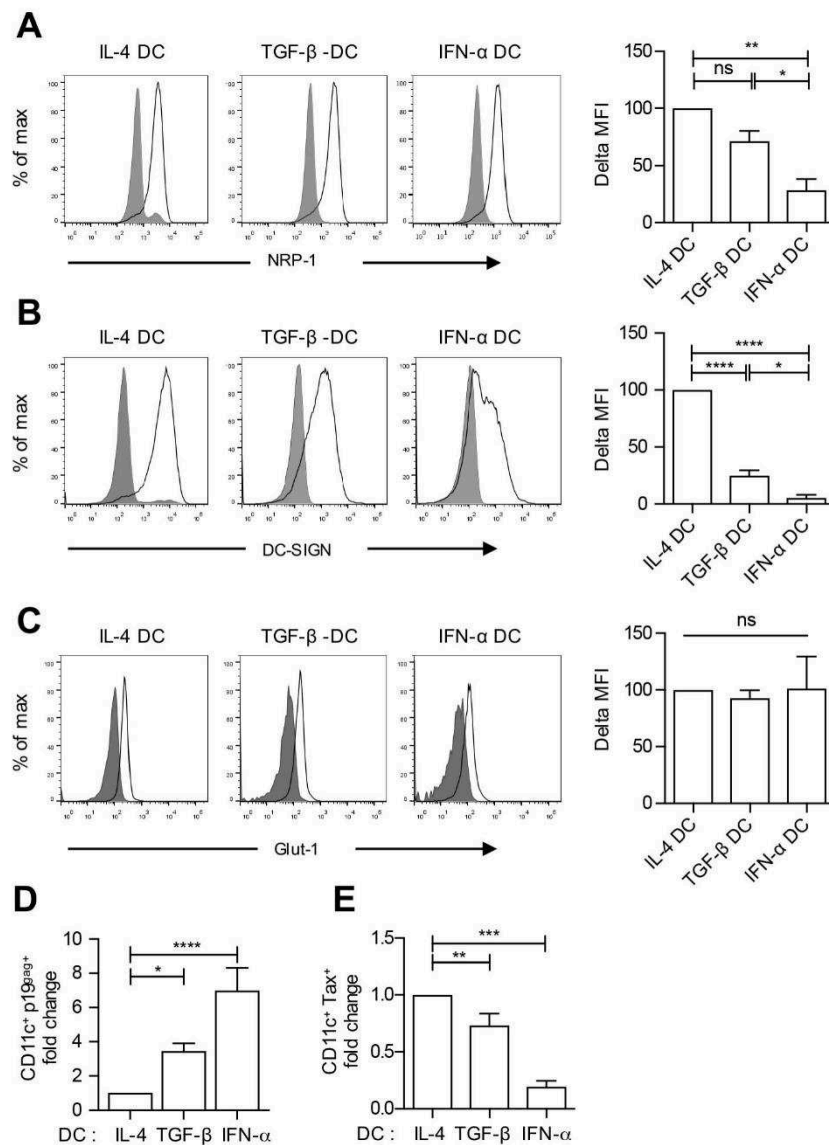
Surprisingly however, treatment of IL-4 DCs with recombinant IFN- $\alpha$  did not affect their susceptibility to HTLV-1 as exemplified by the number of CD11c-positive Tax-positive cells shown for a representative experiment (Fig 3C) and the percentage of infected DCs observed in different experiments performed with cells from several independent donors (Fig 3D), or by the number of p19<sup>gag</sup>-positive cells after 3h of DCs exposure to C91-PL cells (S2B Fig). These results suggest that IL-4 DC exposure to recombinant IFN- $\alpha$  2a does not affect their susceptibility to HTLV-1 infection.

Type I IFN includes IFN- $\beta$  and 12 different IFN- $\alpha$  proteins that have different antiviral properties. IFN- $\alpha$  2a was recently shown to have the weakest antiviral activity against HIV-1 compared to eight others [28]. Thus, recombinant IFN- $\alpha$  2a used above might not be sufficient for the restriction of HTLV-1 infection in IFN- $\alpha$  DCs. To address this issue, we tested the ability of the physiological type I IFN- $\alpha$  present in the supernatant of IFN- $\alpha$  DCs to restrict HTLV-1 infection in IL-4 DCs. Again, the number of Tax positive IL-4 DCs did not differ significantly when cells were cultured for 18 h with or without the supernatant from IFN- $\alpha$  DCs (Fig 3E and 3F), confirming that type I IFN produced by IFN- $\alpha$  DCs is not responsible for the resistance of IFN- $\alpha$  DCs to HTLV-1 infection.

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

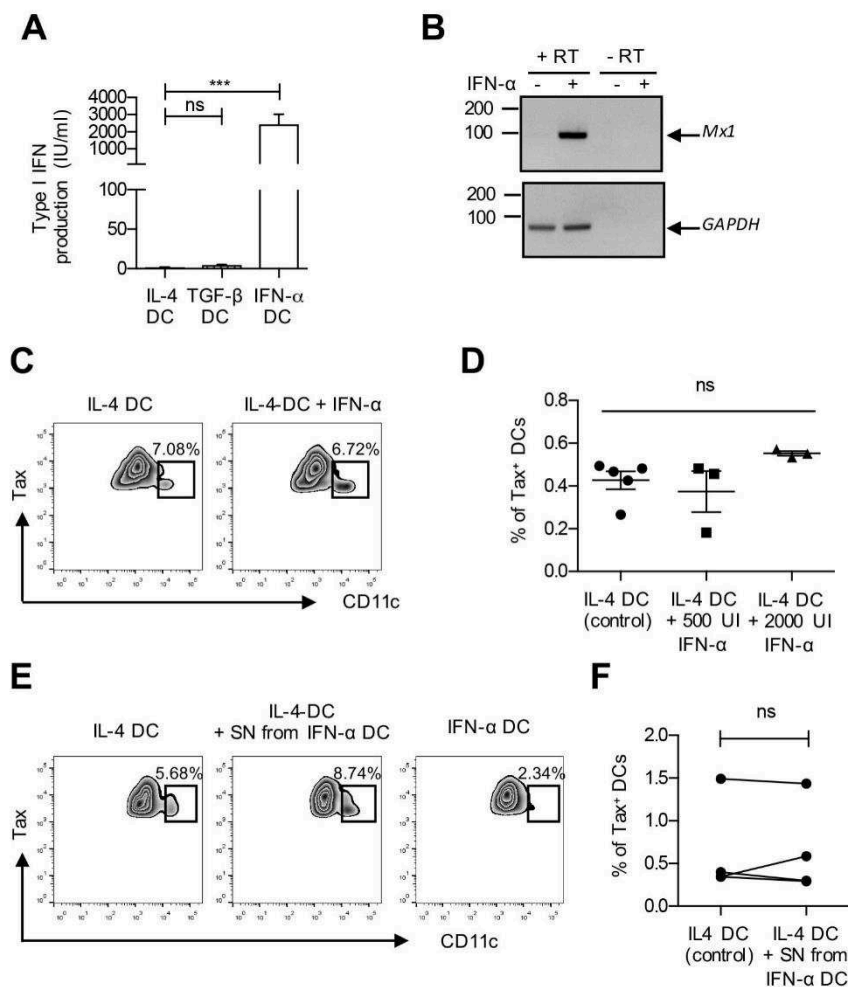
IFN- $\alpha$  DCs are more mature than IL-4 DCs, as shown by the up-regulation of HLA-DR and CD40 markers (S1A Fig and [19]). We thus asked whether DC maturation could account for restriction of HTLV-1 infection in IFN- $\alpha$  DCs. To test this hypothesis, IL-4 DCs were treated with LPS, a TLR-4 agonist, which induces the up-regulation of DC maturation markers such as HLA-DR, CD40 and CD86 (S3A Fig). Both immature and LPS-matured IL-4 DCs were





**Fig 2. Expression of HTLV-1 receptors in IL-4 DCs, TGF-β DCs and IFN-α DCs is inversely correlated to HTLV-1 capture, but correlated to HTLV-1 productive infection.** (A-C) Cells were labeled with fluorochrome-coupled antibodies (black lines) directed against (A) NRP-1, (B) DC-SIGN and (C) Glut-1. Cells stained with matched isotype antibodies were used as negative controls (solid grey graphs). Quantification of the mean fluorescence intensity is represented on the right of each panel as the  $\Delta$  mean fluorescence intensity detected in stained versus unstained cells. Results obtained in 3 independent experiments performed on 3 different donors are presented as percentage of receptor expression normalized to the expression detected in IL-4 DCs. (D) IL-4, TGF-β and IFN-α DCs were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 h, and the percentage of MDDCs expressing the viral p19<sup>gag</sup> protein was assessed by flow cytometry. The mean values from at least 4 independent experiments obtained with different donors were normalized to the percentage of p19<sup>gag</sup> protein detection in IL-4 DCs, and presented as fold change. (E) IL-4, TGF-β and IFN-α DCs from the same blood donors were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 days and productive infection assessed by flow cytometry allowing viral Tax detection. The number of DCs expressing the viral Tax protein was determined and normalized to the number detected in IL-4 DCs. Results are presented as fold changes. (A-E) Asterisks indicate statistically significant differences calculated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test: \*\*\*\*p<0.0001, \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05; ns: non significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006353.g002>



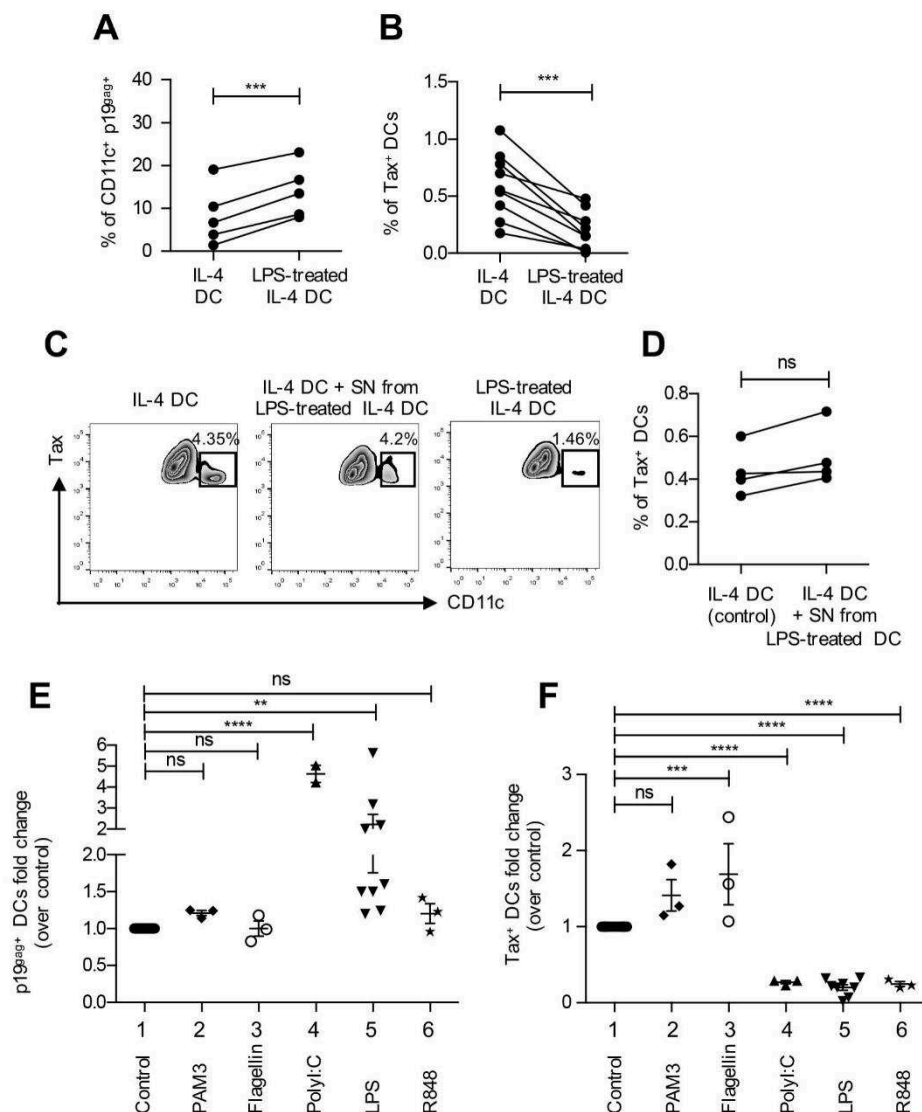
**Fig 3. Recombinant IFN- $\alpha$  or supernatant from IFN- $\alpha$  DCs is inefficient to restrict infection of IL-4 DCs.** (A) Supernatant from IL-4, TGF- $\beta$  and IFN- $\alpha$  DCs derived from the same donors were collected after differentiation and type I IFN levels measured using HL116 reporter cells expressing ISRE-Luc. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test: \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns: non significant. (B) IL-4 DCs were treated with 500 IU/ml of recombinant IFN- $\alpha$  for 18 h, or left untreated as a control. Total RNA was extracted and retro-transcribed (RT). PCR was performed using *Mx1* or *GAPDH* specific primers. Absence of DNA contamination was controlled using PCR amplification on total RNA in the absence of RT treatment. (C) IL-4 DCs were treated or not with recombinant IFN- $\alpha$  (500 or 2000 IU/ml) before co-culture with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 days, and Tax expression was measured. Cells from the co-culture were first gated on Tax expression and then on CD11c expression. The Tax-expressing DC population is shown in the box, as well as the percentage of Tax expressing DC in the Tax positive population. A representative experiment is shown as zebra plots. (D) The percentage of infected CD11c<sup>+</sup> Tax<sup>+</sup> DCs was determined after treatment of IL-4 DCs with increasing amounts of recombinant IFN- $\alpha$  2a. Results from at least 3 independent experiments with different donors are shown. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA: ns: non significant. (E) IL-4 DCs were treated or not with the supernatant from IFN- $\alpha$  DCs before co-culture with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 days, and Tax expression was measured. IFN- $\alpha$  DCs were included as a control. Cells were then gated and results represented as in (C). (F) The results from 4 independent experiments obtained with different donors are presented as in (D). Statistical analysis was performed using a t-test: ns: non significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006353.g003>

then exposed to C91-PL cells for 3 h to measure viral capture, or for 3 days to measure productive infection. Similar to our results with IFN- $\alpha$  DCs, the percentage of p19<sup>gag</sup>-positive DCs was significantly higher in LPS-matured DCs (Fig 4A), while the percentage of Tax positive DCs was significantly lower when cells had been matured with LPS (Fig 4B). This indicates that LPS treatment of IL-4 DCs increases HTLV-1 uptake but restricts their productive infection and seems to recapitulate IFN- $\alpha$  DC restriction of HTLV-1. LPS-treatment of IL-4 DCs induced their maturation and was also accompanied with type I IFN production (S4B Fig). We thus tested whether type I IFN production after LPS-treatment could account for the decreased level of HTLV-1 productive infection. IL-4 DCs were treated with LPS for 3 h. Medium was then removed, cells were extensively washed to remove any trace of LPS and cultured for 18 h in LPS-free medium. Culture supernatant was then collected and added to another set of the same autologous IL-4 DCs. Addition of this supernatant induced an increase in CD86 expression level although lower to that of fully matured DCs, without any other change in the expression of CD40 or HLA-DR maturation markers (S3A Fig). Interestingly, treatment of IL-4 DCs with the supernatant from LPS-matured DCs did neither affect DC susceptibility to HTLV-1 as shown using a result from one representative experiment (Fig 4C) nor the percentage of infected DCs observed in different experiments performed on independent donors (Fig 4D and S3B Fig), or the number of p19<sup>gag</sup>-positive cells (S3C Fig). These results suggest that maturation rather than type I IFN production accounts for the decreased susceptibility of LPS-matured DCs to HTLV-1 infection. To confirm this hypothesis, we induced IL-4 DC maturation with different TLR agonist treatments. Stimulation of IL-4 DCs with PolyI:C, R848 or LPS, that are agonists of TLR-3, TLR-7/8 or TLR-4 respectively, induced a fully mature phenotype, as measured by the up-regulation of HLA-DR, CD86 and CD40 (S4A Fig) and type I IFN production (S4B Fig). In contrast, stimulation of IL-4 DCs with PAM3 or flagellin that are ligands of TLR-2 or TLR-5 respectively, induced an incomplete mature phenotype (S4A Fig) with no type I IFN production (S4B Fig). Interestingly, while treatment with ligands of TLR-3 or TLR-4 significantly increased viral capture (Fig 4E lanes 4 and 5), treatment with ligands of TLR-3, TLR-7/8 or TLR-4 significantly decreased productive infection (Fig 4E, lanes 4–6). In contrast, treatment with ligands of TLR-2 or TLR-5 did not affect viral capture (Fig 4E, lanes 2–3) but led to an increased productive infection of IL-4 DCs (Fig 4F, lanes 2–3). Altogether, these results suggest that DC maturation independently of type I IFN present in the supernatant of matured DC is responsible for the restriction of HTLV-1 infection in DCs.

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

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



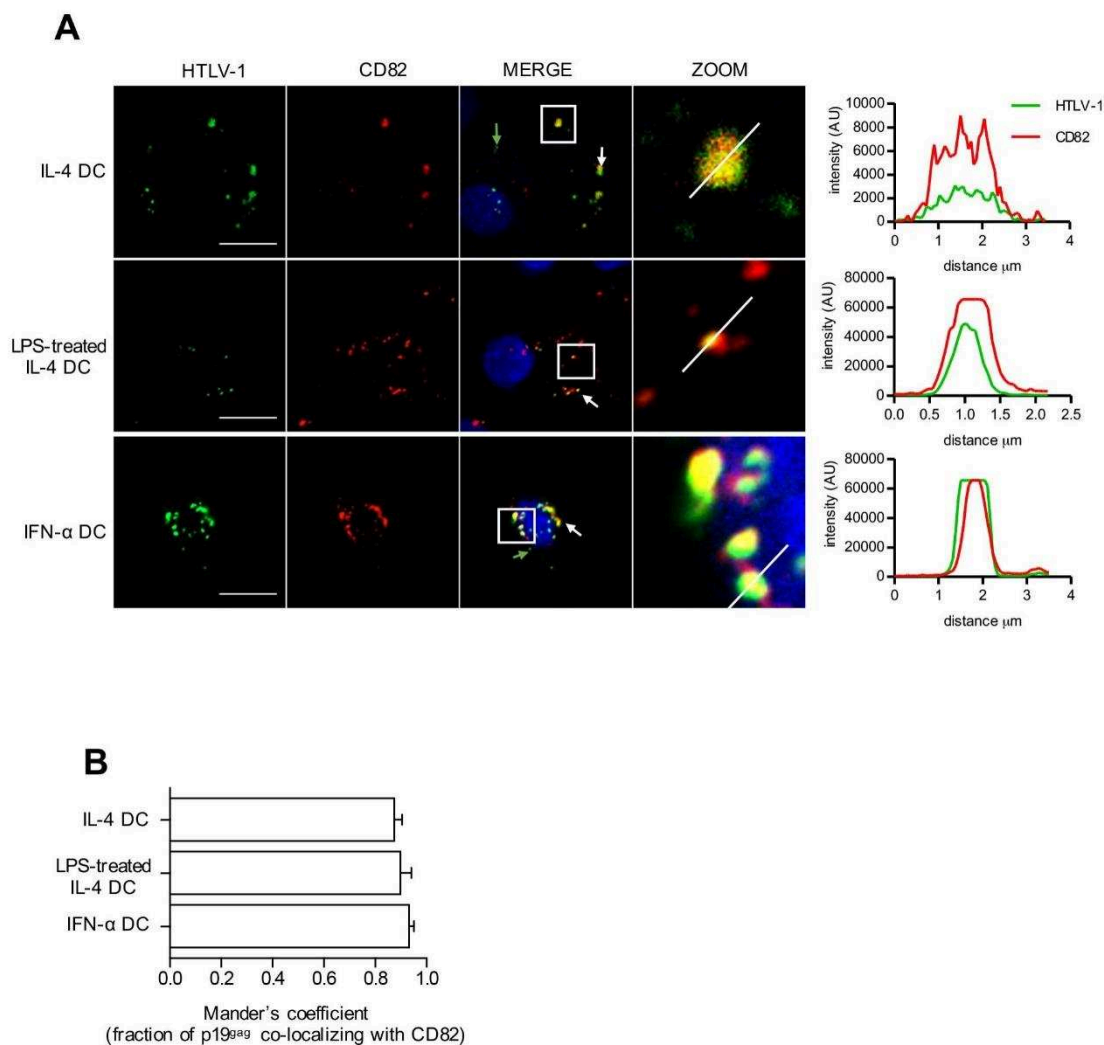
**Fig 4. DC maturation is responsible for restriction of HTLV-1 productive infection.** (A) IL-4 DCs were treated with the TLR-4 ligand LPS before co-culture with C91-PL for 3 h, and viral capture measured by flow cytometry using p19<sup>gag</sup> detection. Untreated IL-4 DCs were used as a control. The percentage of DCs expressing p19<sup>gag</sup> is shown for immature IL-4 DCs and LPS-treated IL-4 DCs from the same donor. Results from 5 independent experiments performed on different donors are shown. Statistical analysis was performed using a t-test: \*\*\**p*<0.001. (B) IL-4 DCs were treated with LPS before co-culture with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 days, and productive infection measured by flow cytometry using Tax protein detection. Untreated IL-4 DCs were used as a control. The percentage of DCs expressing Tax is shown for immature IL-4 DCs and LPS-treated IL-4 DCs from the same donor. Paired results from 9 independent experiments performed on different donors are shown. Statistical analysis was performed using a t-test: \*\*\**p*< 0.001. (C) IL-4 DCs were treated or not with the supernatant from LPS-treated DCs (middle plot) before co-culture with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 days, and Tax protein expression was measured. LPS-treated DCs were included as a control (right plot). Cells from the co-culture were first gated on Tax expression and then the infected DC population expressing Tax was determined on CD11c expression. A representative experiment is shown as zebra plots with the infected Tax<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC population squared, and the percentage of Tax expressing DCs in the Tax positive population is indicated. (D) The percentage of DCs expressing Tax was measured for IL-4 DCs (control) or for IL-4 DCs treated with the supernatant from LPS-treated DCs from the same donor co-cultured with

mitomycin-treated C91-PL cells for 3 days. Results from 4 independent experiments performed on different donors are shown. Statistical analysis was performed using a t-test: ns: non significant. **(E)** IL-4 DCs were left untreated as controls or treated with the TLR-2 ligand PAM3CSK4, the TLR-5 ligand flagellin, the TLR-3 ligand PolyI:C, the TLR-4 ligand LPS or the TLR-7/8 ligand R848 before co-culture with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 h, and viral capture measured by flow cytometry using p19<sup>gag</sup> staining. The percentage of DCs stained for p19<sup>gag</sup> was determined and normalized to that of control IL-4 DCs. Results from at least 3 independent experiments performed on different donors are represented as fold increase over control. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test: \*\*\*\* p<0.0001, \*\* p<0.01, ns: non significant. **(F)** IL-4 DCs were left untreated or treated with the TLR-2 ligand PAM3CSK4, the TLR-5 ligand flagellin, the TLR-3 ligand PolyI:C, the TLR-4 ligand LPS or the TLR-7/8 ligand R848 before co-culture with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 days, and productive infection measured by flow cytometry using Tax expression. The percentage of Tax expressing DCs was determined and normalized to that of control IL-4 DCs. Results from at least 3 independent experiments performed on different donors are represented as fold increase over control. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test: \*\*\*\* p<0.0001, \*\*\* p<0.001, ns: non significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006353.g004>

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

To explain the differential susceptibility to HTLV-1 infection, we hypothesized that viral entry mechanisms might differ in IL-4 DCs vs. LPS-matured and IFN- $\alpha$  DCs. Vesicular entry pathways are mediated by several mechanisms of endocytosis that can be blocked by pharmacological inhibitors. Hence, immature IL-4 DCs, LPS-matured IL-4 DCs or IFN- $\alpha$  DCs were treated with inhibitors targeting dynamin-mediated and clathrin-mediated endocytosis (dynasore and chlorpromazine respectively), caveolin-mediated endocytosis (methyl- $\beta$ -cyclodextrin and nystatin), actin polymerization (latrunculin, cytochalasin D) or macropinocytosis (amiloride) before being co-cultured with C91-PL infected cells. We controlled that treatment with inhibitors did not change the viability of the different DC subsets compared to untreated DCs (S6A and S6B Fig). Viral capture was measured after 3 h of contact with C91-PL. Treatment with methyl- $\beta$ -cyclodextrin and nystatin, that depleted cholesterol as controlled by the lack of lipids droplets stained by Nile red in IL-4 treated DCs (S6C Fig), did not affect p19<sup>gag</sup> levels (S6D Fig), suggesting that HTLV-1 entry does not follow caveolin-mediated endocytosis. However, HTLV-1 entry was significantly reduced by both chlorpromazine and latrunculin (Fig 6A), suggesting a requirement for clathrin-mediated endocytosis and actin polymerization. Interestingly, HTLV-1 entry was significantly reduced by amiloride and dynasore in immature IL4 DCs and LPS-matured DCs but not in IFN- $\alpha$  DCs (Fig 6A), suggesting the requirement of macropinocytosis specifically in immature and mature IL-4 DCs. Macropinocytosis involves PI3K and PKC that control actin polymerization through the activation of Rac 1 GTPase. Rac 1 GTPase in turn controls the polymerization of actin through the activation of Pak-1. All these processes finally lead to the extension of filopodia that fold back onto the cell membrane to form large irregular macropinosomes [29]. HTLV-1 entry was blocked in immature and LPS-matured IL-4 DCs by the PI3K inhibitor wortmanin, the PKC inhibitors rottlerin and Gö6976, and inhibitors of Rac 1 (NSC23766) and Pak1 (IPA-3) (Fig 6B). This further confirms the implication of macropinocytosis in HTLV-1 entry in these subsets. Interestingly, compared to entry in IL-4 DCs, HTLV-1 entry in LPS-matured DCs was more reduced after treatment with genistein, rottlerin and NSC, less reduced after treatment with Gö6976 and not blocked by the inhibitor of actin fibers elongation cytochalasin D (Fig 6B), suggesting the involvement of a different macropinocytosis process in LPS-matured DCs. Finally, HTLV-1 entry in immature and LPS-matured IL-4 DCs was not blocked by nocodazole and blebbistatin, suggesting that microtubule or myosin contraction are not involved in the macropinocytosis process of HTLV-1 entry (S6E Fig). Altogether, these results demonstrate that HTLV-1 entry in



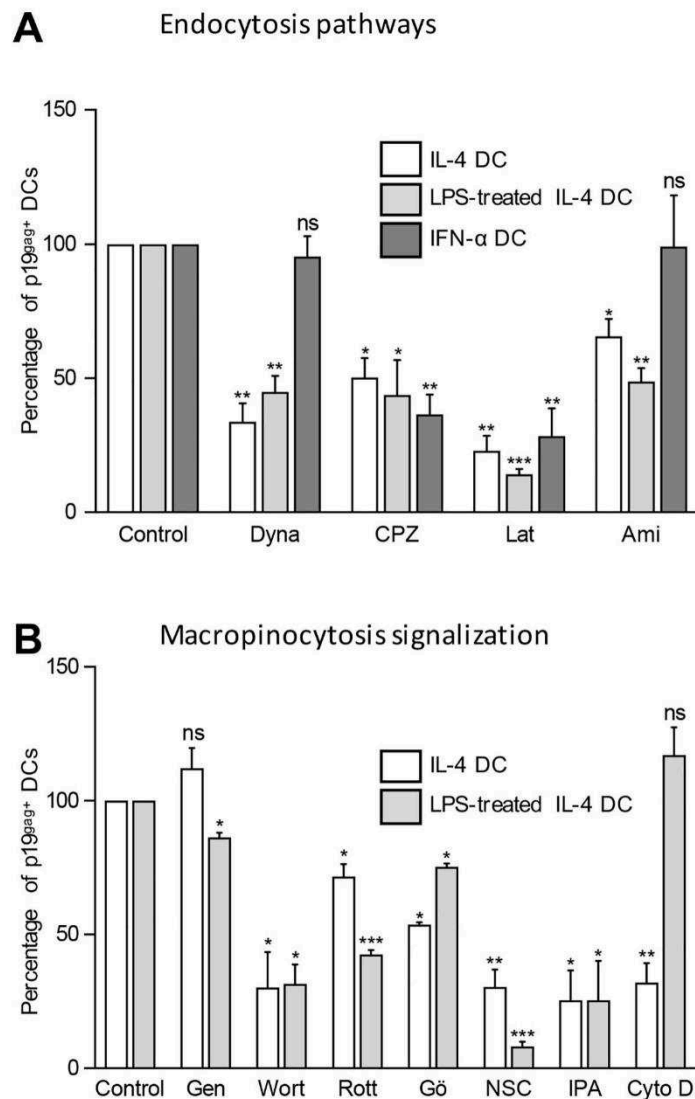
**Fig 5. HTLV-1 localizes in CD82<sup>+</sup> vesicles after capture by DCs.** (A) IL-4 DCs, LPS-treated IL-4 DCs and IFN- $\alpha$  DCs were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 h, and immunostained for HTLV-1 (green) and CD82 (red) before analysis by confocal microscopy. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). White arrows show co-localization of HTLV-1 and CD82. Green arrows show vesicles stained with HTLV-1 only. Representative images obtained by confocal microscopy are shown. HTLV-1 and CD82 signals were quantified along the segment represented on the zoom panel and plotted on the histogram. Scale bars = 10  $\mu$ m. (B) Co-localization of HTLV-1 signal with CD82 signal was calculated using Mander's coefficient.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006353.g005>

immature and LPS-matured IL4-DCs requires macropinocytosis as well as clathrin-mediated endocytosis while entry in IFN- $\alpha$  DC used mainly clathrin-mediated endocytosis.

### Acidic pH of vesicles decreases DC infection

Since HTLV-1 entry pathways, and intracellular localization are similar in immature IL-4 DCs that are susceptible to infection and in IFN- $\alpha$  DCs that are resistant to infection, we next wondered whether intravesicular pH could modify the ability of the virus to establish a productive infection. Indeed, previous studies reported that immature DCs have vesicles with neutral pH,



**Fig 6. HTLV-1 uses macropinocytosis pathways to enter into IL-4 DCs and LPS-stimulated IL-4 DCs, but not in IFN-α DCs. (A-B)** IL-4 DCs (white bars), LPS treated IL-4 DCs (light gray bars) or IFN-α DCs (dark gray bars) were treated for 3 h with (A) clathrin-mediated endocytosis inhibitors (chlorpromazine, CPZ), dynamin II inhibitors (dynasore, Dyna), actin polymerization inhibitors (latrunculin, Lat) or macropinocytosis inhibitors (amiloride, ami) or (B) constitutive macropinocytosis inhibitors (genistein, Gen), PI3K inhibitor (wortmanin, Wort), PKC inhibitors (rotterlin, Rott and Gö6976), Rac-1 inhibitors (NSC23766, NSC), Pak-1 inhibitor (IPA-3, IPA), and actin inhibitor (Cytochalasin D, Cyto D). After treatment, DCs were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 h and viral capture determined by flow cytometry using p19<sup>gag</sup> staining. DCs treated with DMSO, ethanol or medium depending on the solvent used for inhibitor solubilization (see [material and methods](#) section) were used as controls. The percentage of DCs positive for p19<sup>gag</sup> was determined for each condition and normalized to that of the untreated control DCs. Results were obtained from 3 independent experiments performed with different blood donors. Asterisks indicate statistically significant differences between treated and untreated DCs calculated using a t-test: \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; ns: non significant.

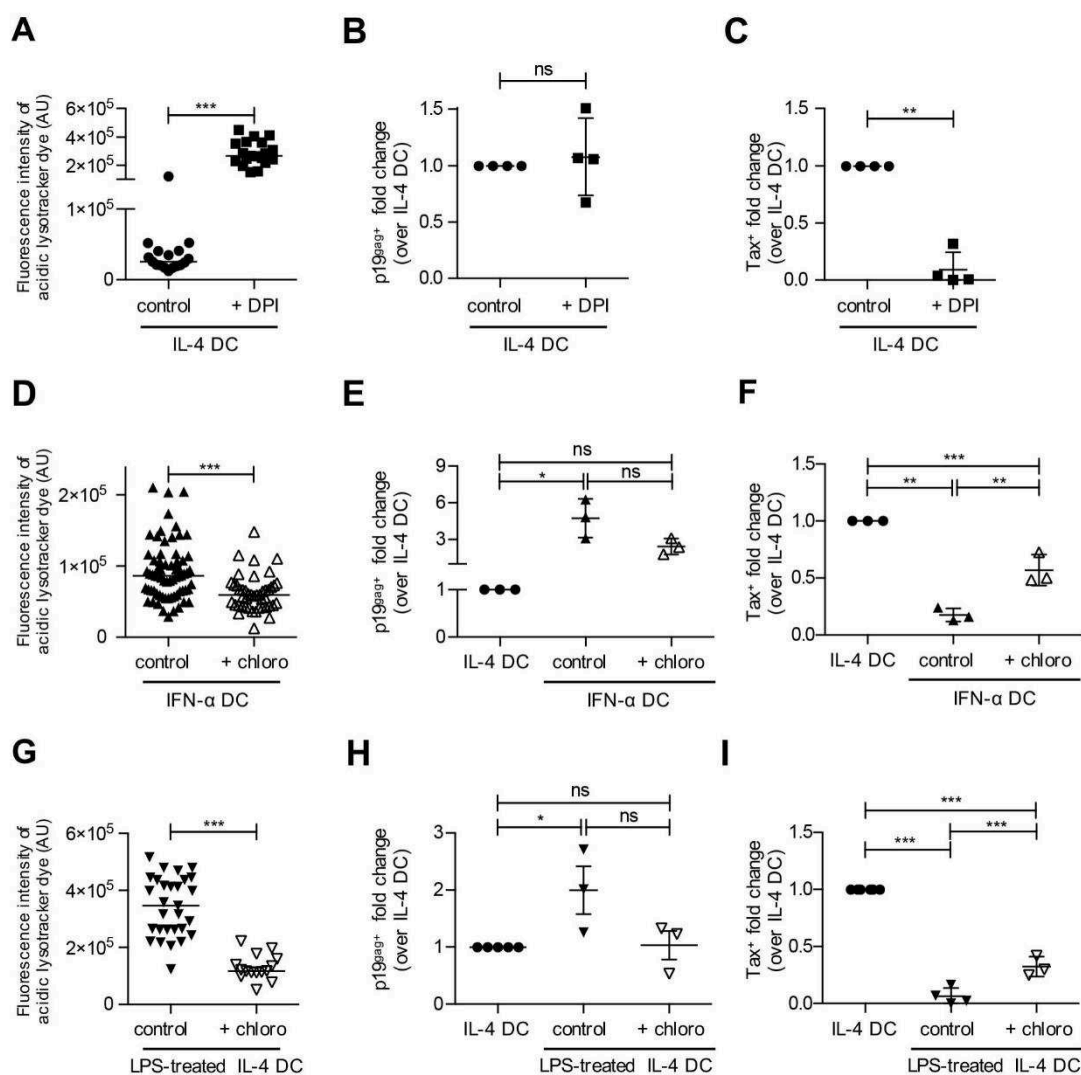
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006353.g006>

while vesicles pH is more acidic in mature DCs [30]. Using acidic lysotracker, which fluorescence intensity is dependent on acidic pH, and using drugs that induce intravesicular acidification (diphenylene-iodonium DPI) or alkalization (chloroquine), we were able to modulate and monitor the pH of vesicles. The neutral pH of vesicles in immature IL-4 DC was acidified after DPI treatment (Fig 7A), while the slightly more acidic pH of vesicles in IFN- $\alpha$  DCs was alkalized after chloroquine treatment (Fig 7D). As a control, the acidic pH of vesicles in LPS-treated DCs was alkalized after chloroquine treatment (Fig 7G). IL-4 DCs treated with DPI captured similar amount of HTLV-1 than untreated IL-4 DCs when co-cultured with C91PL (Fig 7B). However, productive infection was significantly reduced under these conditions (Fig 7C). This suggests that HTLV-1 trafficking into acidic vesicles inhibits productive infection of IL-4 DCs. In contrast, in the same co-culture conditions, chloroquine treatment of IFN- $\alpha$  DCs, reduced viral capture to a level similar to that of IL-4 DCs, (Fig 7E). In addition, Tax expression was significantly increased in chloroquine-treated IFN- $\alpha$  DCs compared to untreated IFN- $\alpha$  DCs, although it did not reach the level of Tax expression in IL-4 DCs (Fig 7F). This suggests that productive infection is only partially restored by alkalization of IFN- $\alpha$  DC vesicles. Similar results were obtained after treatment of LPS-matured DCs before their co-culture with C91-PL (Fig 7H and 7I), further suggesting that alkalization of matured DC vesicles partially restores productive infection. Altogether, our results suggest that productive infection of DCs by HTLV-1 requires a neutral pH of vesicles and an immature phenotype of the DCs.

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

We have previously shown that productive infection of IL-4 DCs was the main route of HTLV-1 transmission to lymphocytes, although passive transfer from HTLV-1-exposed IL-4 DCs in presence of AZT may have occurred in rare cases [9]. This passive transfer, also known as “trans-infection” (for a review see [31]), results from transmission of captured viral particles without productive infection, and is the main route used by HIV-1 for spreading to T-cells [32]. Since viral capture is around three-fold higher in LPS-matured DCs (see Fig 4E) and six-fold higher in IFN- $\alpha$  DCs (see Fig 2D) than in IL-4 DCs, we hypothesized that trans-infection might occur preferentially with mature DCs compared to IL-4 DCs. IL-4 DCs, LPS-treated DCs or IFN- $\alpha$  DCs were thus exposed to C91-PL for 3 h to allow viral capture, and then separated from C91-PL using positive selection with anti-BDCA-4 antibodies. We controlled that the DC phenotype was not changed after the purification process (S7A and S7B Fig) and allowed the removal of at least 95% of C91-PL (S7C Fig). Purified DCs were then co-cultured for 2 days with Jurkat LTR-Luc reporter cells, (Fig 8A). Luciferase signals significantly decreased when co-culture was performed with LPS-treated IL-4 DCs or IFN- $\alpha$  DCs, compared to co-culture with IL-4 DCs (Fig 8A). Interestingly, when IFN- $\alpha$  DCs were treated with chloroquine before co-culture with C91-PL, luciferase signals were significantly higher compared to co-culture with untreated IFN- $\alpha$  DCs (Fig 8A see graph). These results suggest that although HTLV-1 capture is higher in mature DCs, internalized virus in acidic vesicles cannot be transferred to T-cells. To control that the decreased luciferase signals were not due to a decreased ability of IFN- $\alpha$  or LPS-treated DCs to engage cell-to-cell contacts with Jurkat-LTR-Luc cells, we counted the number of DC-Jurkat-LTR-Luc conjugates in co-cultures containing DCs, C91-PL and Jurkat-LTR-Luc cells. To distinguish the different cell types in the co-culture, C91-PL were stained with a cell tracker and appeared in red, while Jurkat-LTR-Luc cells were transduced with GFP-expressing lentivectors, and appeared in green. DCs were left unstained (Fig 8B). The number of cell conjugates between unstained DCs and GFP-labelled Jurkat-LTR-Luc cells after 3 h of co-culture did not change significantly when IL-4, IFN- $\alpha$  or





**Fig 7. Acidic pH of vesicles decreases DC infection.** (A) IL-4 DCs were treated with 10 $\mu$ M DPI for 3 h and incubated for 30 minutes with a pH-sensitive lysotracker fluorescent dye. Fluorescence intensity was determined using ImageJ. Results are representative of at least three independent experiments performed on different donors. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using a t-test: \*\*\*  $p < 0.001$ . (B) DPI-treated IL-4 DCs or untreated IL-4 DCs control were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 h. Viral capture was measured by flow cytometry using p19<sup>gag</sup> staining. The percentage of p19<sup>gag</sup>-positive DCs was normalized to that of control IL-4 untreated DCs and presented as fold changes over control. Results are representative of 4 independent experiments performed on different donors. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using a t-test: ns: non significant. (C) DPI-treated IL-4 DCs or untreated IL-4 DCs control were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 days. Productive infection was measured by flow cytometry using Tax staining. The number of Tax-expressing DCs was normalized to that of control IL-4 untreated DCs and presented as fold changes over control. Results are representative of 4 independent experiments performed on different donors. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using a t-test: \*\*  $p < 0.01$ . (D) IFN- $\alpha$  DCs were treated for 3 h with 150  $\mu$ M chloroquine, and incubated with lysotracker fluorescent dye for 30 minutes. Fluorescence intensity determined using ImageJ was compared using a t-test: \*\*\*  $p < 0.001$ . Results are representative of at least 3 independent experiments performed on different donors. (E) Chloroquine-treated IFN- $\alpha$  DCs or untreated IL-4 and IFN- $\alpha$  DCs used as controls were co-cultured with C91-PL for 3 h. Viral capture was measured by flow cytometry using p19<sup>gag</sup> staining. The percentage of p19<sup>gag</sup>-positive DCs was normalized to that of control IL-4 untreated DCs and presented as fold change over control. Results are representative of at least 3 independent experiments performed on different donors. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test: \*  $p < 0.05$  ns: non significant. (F) Chloroquine-treated IFN- $\alpha$  DCs or untreated IL-4 and IFN- $\alpha$  DCs used as controls were co-cultured

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

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006353.g007>

LPS-treated DCs were used (Fig 8B, see graph), suggesting that decreased viral transfer from IFN- $\alpha$  DCs and LPS-treated DCs was not due to a lack of contacts with Jurkat cells. Next, IL-4 DCs, LPS-treated DCs or IFN- $\alpha$  DCs were exposed to C91-PL for 3 h, purified using positive selection with anti-BDCA-4 antibodies and cultured for three days to allow productive infection. Then, Jurkat-LTR-Luc reporter cells were added in the MDDCs culture and luciferase signals monitored two days later (Fig 8C). In that setting, IL-4 DCs were able to transfer significant amounts of HTLV-1 (Fig 8C), while reduced luciferase signals were detected using LPS-treated IL-4 DCs or IFN- $\alpha$  DCs (Fig 8C), confirming that productive infection is required to allow virus transfer to T-cells. This was further controlled using AZT treatment, which significantly reduced luciferase signals.

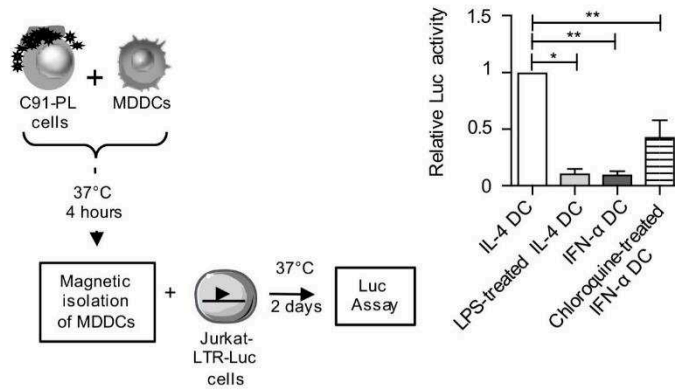
Surprisingly, AZT treatment of LPS-treated IL-4 DCs or IFN- $\alpha$  DCs also reduced luciferase signals observed with the untreated DC subsets, suggesting that the viral transfer observed with these subsets relies on their productive infection and not on long term viral capture (Fig 8C). In addition,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

## Discussion

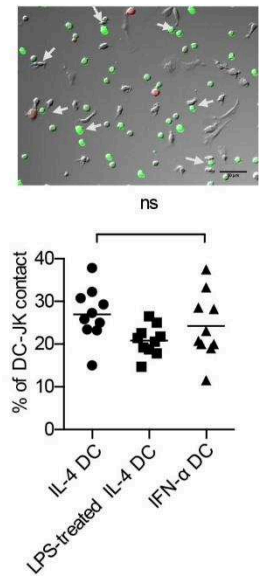
Apart from circulating CD4<sup>+</sup> T lymphocytes that represent the main infected cell population in chronically infected individuals, HTLV-1 proviral DNA is also detected in antigen presenting cells (APCs) such as myeloid DCs [33], monocytes and plasmacytoid DCs [11]. We previously showed that *in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

Surprisingly, resistance is neither due to the presence of high level of type-I interferon produced by inflammatory DCs or mature DCs, nor to the exogenous recombinant interferon used to generate those DCs. Interestingly, these results are different from previous reports,

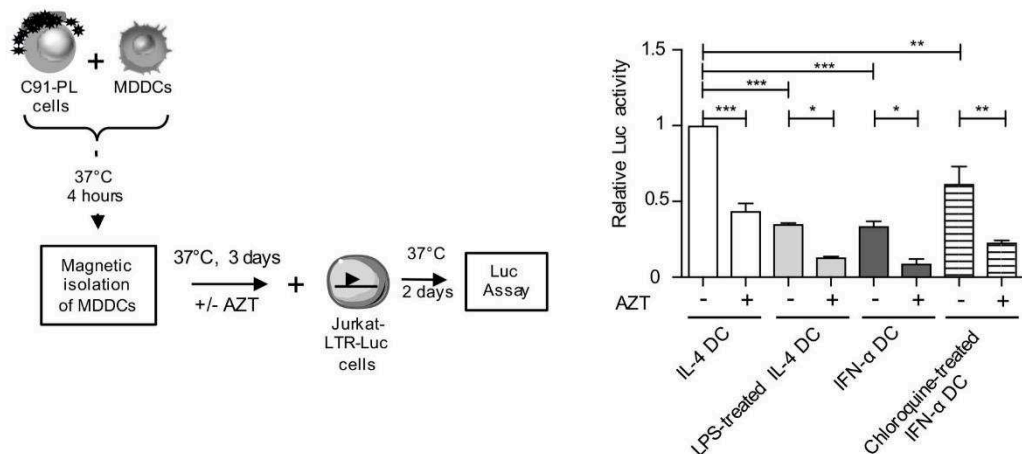
**A** Trans-infection assay



**B** DC-JK contacts



**C** Cis-infection assay



**Fig 8. HTLV-1 is transferred to reporter T-cells from IL-4 DCs but not from LPS-treated or IFN-α DCs. (A)** DCs were exposed to mitomycin-treated C91-PL cells for 4 h and isolated from C91-PL using positive selection with magnetic beads coated with anti BDCA-4 antibodies. Then, purified MDDCs were co-cultured with Jurkat-LTR-Luc cells and luciferase activity was assessed after 2 days. When indicated, IFN-α DCs were treated with chloroquine before their exposure to C91-PL. The graph shows the means and the standard deviations from 3 independent experiments obtained with different donors. Background signal due to leaky luciferase activity of Jurkat-LTR-Luc cells was subtracted and results were normalized to the luciferase activity of Jurkat-LTR-Luc measured after co-culture with IL-4 DCs and presented as fold change over control. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test: \* p<0.05, \*\* p<0.01. **(B)** DCs were mixed with GFP-transduced Jurkat-LTR-Luc cells and C91-PL cells stained with a red cell tracker, and contacts were visualized by fluorescence microscopy. Arrows indicate contacts between unstained DCs and GFP-transduced Jurkat-LTR-Luc cells (JK). Scale bar = 50µm. Contacts between DCs and GFP-transduced Jurkat-LTR-Luc cells were manually counted, normalized to the number of DCs in the picture analyzed, and represented as percentages. Results are representative of three independent experiments performed on different donors. Statistics were performed using one-way ANOVA. ns: non significant. **(C)** DCs were exposed to mitomycin-treated C91-PL cells for 4 h, isolated by positive selection and cultured for 3 days, in presence or absence of AZT. Then, Jurkat-LTR-Luc cells were added and luciferase activity was assessed 2 days later. When indicated, IFN-α DCs were treated with chloroquine before

their exposure to C91-PL. The graph shows the means and the standard deviations from 3 independent experiments obtained with different donors. Results were normalized to the luciferase activity of Jurkat-LTR-Luc measured after co-culture with IL-4 DCs and presented as fold changes over control. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test: \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006353.g008>

including ours, obtained in T-cells, which showed that their susceptibility to HTLV-1 infection is sensitive to IFN- $\alpha$  [23,27]. Of note, cell-type-dependent susceptibility to IFN has already been reported and was linked to the use of cell-type-specific patterns of STAT activation as well as to usage of additional signaling components that can finely tune ISGs expression in a given cell type [34,35]. In addition, substantial quantitative differences in STAT activation in different cell-types may be linked to the induction of the same ISGs but with different amplitude [36]. In T-cells, treatment with exogenous IFN- $\alpha 2$  results in a block in HTLV-1 protein expression, due to protein kinase R (PKR) activation while the early steps of the viral cycle are maintained [23]. Strikingly, it was shown that treatment with recombinant IFN- $\alpha 2$  induced a higher expression of PKR in DCs than in T-cells [36]. Thus, our results, which demonstrate a lack of antiviral control in DCs after IFN treatment, suggest that PKR induction in DCs might not be as efficient as in T-cells to restrict HTLV-1 infection. Alternatively, PKR phosphorylation that is required for its antiviral activity might not be present or sufficient in DCs treated with type I IFN. In addition, PKR antiviral activity could be counterbalanced by the concomitant induction of ADAR-1 (Adenosine Deaminase Acting on RNA type 1), another ISG that has been shown to enhance replication of several viruses [37]. Interestingly, ADAR-1 expression in T-cells suppresses IFN- $\alpha$  inhibitory effect on HTLV-1 expression through the repression of PKR phosphorylation [38]. Thus, the inability of IFN- $\alpha$  to restrict HTLV-1 infection in DCs might be the result of an unbalanced expression of ADAR-1 over that of PKR.

Our results also demonstrated that restriction was not due to a lack of viral entry in mature DCs, although the level of viral binding receptors is lower than in susceptible DCs. This suggests that viral capture by DCs that have been exposed to infected cells may use other receptors. Interestingly, HTLV-1 was observed in CD82 positive compartment in all DC subsets. CD82 is a tetraspanin receptor located in MVBs and at the plasma membrane, and has been shown to interact with the HTLV-1 envelope glycoprotein in T-cells [39]. Thus, one could hypothesize that CD82 is used by HTLV-1 to enter DCs during cell-to-cell transfer, and maybe involved in the targeting of HTLV-1 to vesicles in DCs. This is currently under investigation in our laboratory. Indeed, localization of incoming viruses in vesicles in both susceptible and resistant DCs could reflect a distinct entry route in these cell types compared to T-cells, in which it is assumed that HTLV-1 entry occurs after fusion at the plasma membrane [40]. We observed that the level of the fusion receptor Glut-1 is similar in the three DC subsets, suggesting that HTLV-1 capsids could be delivered to the cytosol after fusion of the viral envelope with the membrane of the vesicles. Accordingly, both in susceptible DCs and in restricted DCs in which vesicles had been alkalinized after treatment with chloroquine, Tax expression was detected. This indicates that the viral cycle can be completed after the virus had trafficked through the endocytosis pathway. In contrast, Tax was not detected in susceptible DCs in which vesicles had been acidified after treatment with DPI, thus in which incoming vesicular viruses had been inactivated. This suggests that viral fusion at the plasma membrane, even if it is present, does not allow a productive infection. Vesicular uptake of viruses may not be limited to DCs and could be a feature of cell-to-cell transmission. Indeed, such a mechanism was also reported during HIV-1 cell-to-cell transfer between T-cells [41,42,43]. In that case, viral fusion occurred in the vesicles of the target cells after the late maturation of Gag proteins, authorizing the interaction of HIV-1 envelope with its co-receptor and thus the release of

HIV-1 capsids into the cytoplasm, and subsequent productive infection [44]. It is thus possible that similar entry pathways occur during HTLV-1 cell-to-cell transmission.

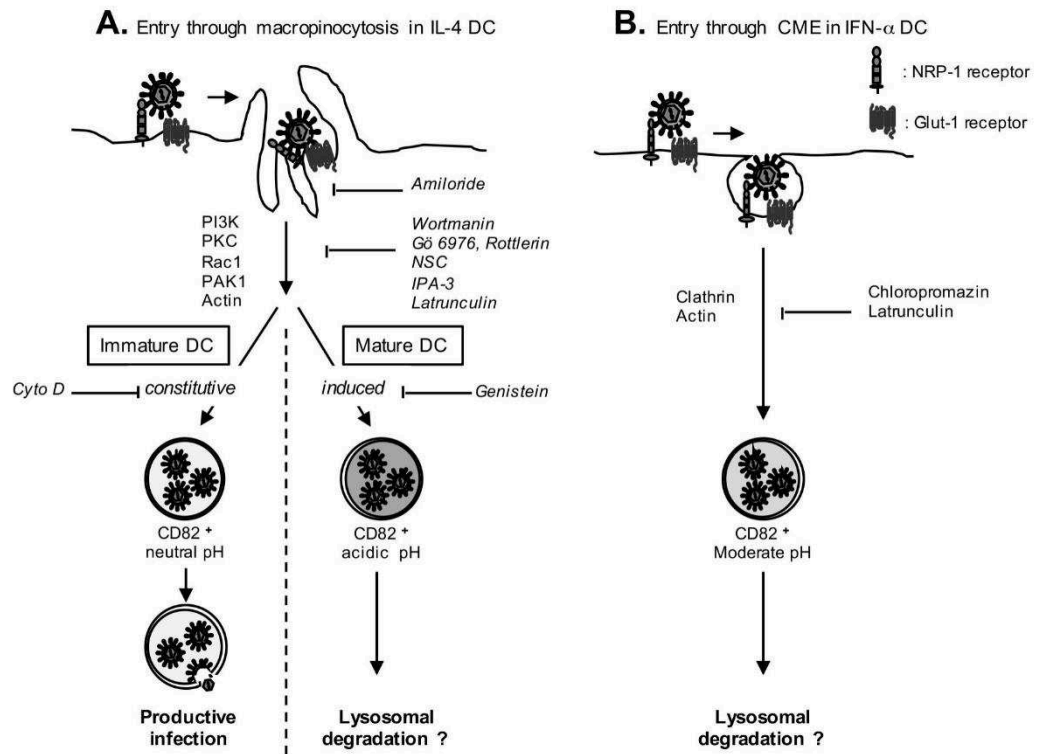
We showed here that maturation of DCs strongly limited their productive infection. Interestingly, it was shown that stimulation of primary hepatocytes with TLR agonists was able to inhibit replication of woodchuck hepatitis B virus (WHBV) in an interferon-independent pathway [45]. In this study, restriction was not due to the expression of a soluble factor nor to activation of JAK/STAT pathway that is specific to IFN signaling, but was induced by TLR signaling via activation of the MAPK/ERK and PI-3K/Akt pathways. It was therefore suggested that TLR-induced proteins could act as restriction factors. We cannot exclude that maturation of DCs may induce HTLV-1 specific restriction factors. However, our results suggest that the first mechanism of HTLV-1 replication restriction relies on a post entry blockade and on specific viral trafficking.

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

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

Thus, based on all our results, we propose a schematic model for HTLV-1 infection of DC subsets (Fig 9). When HTLV-1 encounters immature DCs, viral entry through constitutive macropinocytosis would lead to internalization of HTLV-1 in MVB-like compartments from which the neutral pH would authorize viral capsid exit and completion of the viral replication cycle (Fig 9A, left panel). In contrast, in IFN- $\alpha$  DCs, entry through clathrin-mediated endocytosis and not through macropinocytosis would lead to trafficking in vesicles targeted to degradation (Fig 9B). Finally, if DCs are matured before their interaction with HTLV-1, entry using constitutive macropinocytosis would deliver viruses to vesicles with an acidic pH, that would impair HTLV-1 infection (Fig 9A, right panel). Surprisingly, alkalization of vesicles from mature DCs using chloroquine restored HTLV-1 infection, but only partially with a percentage of infection around 60% lower than that observed in immature DCs. This suggests that in addition to the traffic in acidic compartments, induction of HTLV-1-specific restriction factors induced after DC maturation would insure an efficient blockade of HTLV-1 replication in mature DCs.

Are these different outcomes of HTLV-1 infection in the different DC subsets important for the virus transfer to T-cells? In the HIV-1 model, DCs are resistant to HIV-1 infection due to the presence of several restriction factors [57], and thus most of the viral transfer from DCs to T-cells occurs by trans-infection, which does not require productive infection [58]. More importantly, DC-mediated trans-infection is more efficient when HIV-1 virions have been



**Fig 9. Schematic representation of HTLV-1 entry in IL-4, LPS-treated IL-4, and IFN- $\alpha$  DCs. (A)** Entry through macropinocytosis in IL-4 and LPS-treated DCs. After binding to its receptors NRP-1 and Glut-1, HTLV-1 enters using the transduction pathway characteristic of macropinocytosis, that is common in IL-4 and LPS-treated DCs. Specific drugs are shown on the right side of the first arrow. Neutral pH of macropinosomes from immature DCs is indicated in light grey, while acidic pH from mature DCs is indicated in dark grey. The presence of CD82 is indicated below each macropinosome. **(B)** Entry through clathrin-mediated endocytosis (CME) in IFN- $\alpha$  DCs. After binding to NRP-1 and Glut-1, HTLV-1 enters using clathrin and actin pathway. Specific drugs are shown on the right side of the arrow. The pH of vesicles is indicated by the grey color. See text for details.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006353.g009>

captured by mature DCs [31,59]. Interestingly, DC maturation with TLR agonists also renders them susceptible to X4-tropic HIV-1 infection, although they are still resistant to infection with R5-tropic HIV-1 [60]. This suggests that DC infection with HIV-1 is controlled by several factors that depend upon the DC maturation status and upon HIV-1 strains. Depending on the viral strain, transfer of HIV-1 from DCs to T-cells would use either trans-infection in the case of R5-tropic viruses or cis-infection in the case of X4-tropic viruses. In any case, mature DCs would be responsible for the efficient transfer to T-cells and rapid spreading of HIV-1 within individuals [32]. During HTLV-1 infection, interaction with DCs is also important for the establishment of the chronic infection of T-cells [15,61]. However, since this infection has not been linked to immune activation, HTLV-1 might more likely interact with immature DCs. Thus, our results showing that immature DC are the only subset able to transfer the virus to T-cells, in a process mainly based on their productive infection, is relevant to the *in vivo* situation. The nature of the DCs encountered by HTLV-1 upon primo-infection, which display a differential susceptibility to HTLV-1 infection, would therefore determine the efficiency of viral transmission to T-cells. Finally, in contrast to the dissemination of HIV-1 by mature DCs, our results strongly suggest that the restriction of HTLV-1 infection in mature DCs and

more importantly, their inability to transfer the virus to T-cells might be an efficient way for the host to limit HTLV-1 spread.

### Supporting information

**S1 Fig. Surface markers in IL-4 DCs, TGF- $\beta$  DCs and IFN- $\alpha$  DCs.** (A) Cells were labeled with fluorochrome-coupled antibodies (black lines) directed against CD11c, HLA-DR, CD83 and CD40. Unstained cells were used as negative controls (black graphs). (B) IL-4 DCs infection was determined by the number of Tax-expressing cells among IL-4 DCs in presence or absence of AZT. Results from 3 independent experiments obtained from different donors are presented. Asterisks indicate statistically significant differences calculated using a paired t-test: \* $p < 0.05$ . (TIF)

**S2 Fig. Recombinant IFN- $\alpha$  does not induce maturation of IL-4 DC and does not affect viral capture.** (A) IL-4 DCs were cultured for 18 h in the presence of exogenous IFN- $\alpha$  (2000 IU/ml). Untreated (white histogram) and IFN- $\alpha$  treated IL-4 DCs (light grey histogram) were stained with antibodies directed against CD11c, DC-SIGN, NRP-1, HLA-DR, CD86 and CD40. Unstained cells were used as negative controls (black graphs). (B) Treated and untreated IL-4 DC from the same blood donor were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 h and the percentage of p19<sup>Gag</sup>-positive DCs was assessed by flow cytometry. Results are representative of 3 independent experiments performed on different donors. T-test was performed to assess statistically significant differences: ns = non significant. (TIF)

**S3 Fig. Treatment of IL-4 DCs with supernatant from LPS-matured DCs does not change IL-4 DC phenotype.** (A) IL-4 DCs from same donor were cultured for 18 h with LPS (black dotted line) or with supernatant from LPS-matured DCs (light grey histogram) or left untreated as a control (black line). Cells were labeled with antibodies against CD11c, DC-SIGN, NRP-1, HLA-DR, CD86 and CD40. Unstained cells were used as negative controls (dark grey histogram). (B and C) IL-4 DCs, IL-4 DCs stimulated with supernatant from LPS-treated IL-4 DCs and LPS-treated IL-4 DCs from the same donor were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 h (C) or 3 days (B) and the number of Tax-positive DCs (B) or the percentage of p19<sup>Gag</sup>-positive DCs (C) were assessed by flow cytometry. DCs were discriminated from the C91-PL population by gating on CD11c expression. The results are shown as number of Tax-positive DCs (B) or as percentage of p19<sup>Gag</sup>-positive DCs (C). (TIF)

**S4 Fig. Phenotype of IL-4 DCs treated with TLR agonists.** (A) IL-4 DCs were left untreated (white histogram) or were treated for 18 h with the TLR-3 ligand PolyI:C, the TLR-4 ligand LPS, the TLR-7/8 ligand R848, the TLR-2 ligand PAM3CSK4 or the TLR-5 ligand flagellin (light grey histogram). Cells were labeled with antibodies against HLA-DR, CD86 and CD40. Unstained cells were used as negative control (dark grey histogram). (B) Supernatant from untreated IL-4 DC or DC treated with the TLR agonists were collected after 18 h of culture and type I IFN levels measured using HL116 reporter cells expressing ISRE-Luc. (TIF)

**S5 Fig. HTLV-1 is not localized in EE1A<sup>+</sup> vesicles after capture by DCs.** IL-4 DCs, LPS-treated IL-4 DCs and IFN- $\alpha$  DCs were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 h, and immunostained for p19<sup>Gag</sup> (red) and EE1A (green) before analysis by confocal microscopy. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Representative images obtained by

confocal microscopy are shown. Scale bars = 10  $\mu$ m.  
(TIF)

**S6 Fig. Treatment with entry inhibitors does not affect cell viability.** IL-4 DCs (black bars), LPS treated IL-4 DCs (light gray bars) or IFN- $\alpha$  DCs (white bars) were treated for 3 h with (A) dynamin II inhibitors (dynasore, Dyna), clathrin-mediated endocytosis inhibitors (chlorpromazine, CPZ), actin polymerization inhibitors (latrunculin, lat) or macropinocytosis inhibitors (amiloride, ami) or (B) with constitutive macropinocytosis inhibitors (genistein, Gen), PI3K inhibitor (wortmanin, Wort), PKC inhibitors (rottlerin, Rott and G06976), Rac-1 inhibitors (NSC23766, NSC), Pak-1 inhibitor (IPA-3, IPA), and actin inhibitor (Cytochalasin D, Cyto D). Cell viability was monitored by FACS using live-dead staining. (C) IL-4 DCs were left untreated (left panel) or treated (right panel) for 3 h with methyl B cyclodextrine (M $\beta$ CD), fixed and incubated for 15 min with Nile red to stain lipid droplets (green). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Cells were visualized by fluorescence microscopy. (D-E) IL-4 DCs (black bars) or LPS treated IL-4 DCs (light gray bars) were treated for 3 h with nystatin or M $\beta$ CD to deplete cholesterol (D) or nocodazole (Noco) or blebstatin (bleb) to block microtubule polymerization (E). After treatment, DCs were co-cultured with mitomycin-treated C91-PL cells for 3 h and viral capture determined by flow cytometry using p19<sup>gag</sup> staining. DCs treated with DMSO were used as controls. The percentage of DCs positive for p19<sup>gag</sup> was determined for each condition and normalized to that of the untreated control DCs. Results were obtained from 3 independent experiments performed with different blood donors.  
(TIF)

**S7 Fig. Phenotype of DCs and yield of C91-PL depletion after magnetic bead purification.** (A) Untreated or (B) LPS-treated IL-4 DCs were exposed to C91-PL for 4 h, left untouched (before, white histograms) or magnetically isolated (after, light grey histograms) and labeled with antibodies against CD11c, DC-SIGN, HLA-DR, CD86 and CD40. Unstained cells were used as negative controls (dark grey histogram). (C) The yield of C91-PL depletion after magnetic isolation of IL-4 DCs was estimated by flow cytometry using anti-human CD11c staining. The percentage of C91-PL cells (CD11c negative population) and the percentage of DCs (CD11c positive population) are indicated on each plot before (left) and after (right) magnetic isolation of DCs.  
(TIF)

## Acknowledgments

We thank the microscopy facility team of the Lyon SFR Biosciences, Aurélien Schwob for his help with immunofluorescence figures. We thank Dr Marlène Dreux (CIRI) for providing the PBMCs, Dr Antoine Gessain (Pasteur Institute) for the HTLV-1 serum, Dr S. Pelligrini (Pasteur Institute) for the HL116 cells, and Dr M.I. Thoulouze (Pasteur Institute) for the gift of Jurkat LTR-luc cells. We thank Victoire Cardot and Audrey Glaize for their help with the biofilm qPCR experiments. We acknowledge Dr Anna Salvetti (CIRI) and Dr Andrea Cimarelli (CIRI) for helpful discussions.

## Author Contributions

**Conceptualization:** GR RM HD.

**Formal analysis:** GR HD.

**Funding acquisition:** CJ RM HD.



**Investigation:** GR NF SA CJ RM HD.

**Methodology:** GR NF SA.

**Project administration:** RM HD.

**Resources:** YT.

**Supervision:** RM HD.

**Validation:** RM HD.

**Visualization:** GR HD.

**Writing – original draft:** GR HD.

**Writing – review & editing:** GR NF SA CJ YT RM HD.

## References

- Gessain A, Cassar O (2012) Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol* 3: 388. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00388> PMID: 23162541
- Bruhn R, Mahieux R, Murphy EL (In press) Human lymphotropic viruses: HTLV-1 and HTLV-2.: Clinical Virology 4th edition, ASM press.
- Willems L, Hasegawa H, Accolla R, Bangham C, Bazarbachi A, et al. (2016) Reducing the global burden of HTLV-1 infection: An agenda for research and action. *Antiviral Res* 137: 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.10.015> PMID: 27840202
- Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H (1977) Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* 50: 481–492. PMID: 301762
- Gessain A, Barin F, Vernant J, Gout O, Maurs L, et al. (1985) Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2: 407–410. PMID: 2863442
- Ceccaldi P-EE, Delebecque F, Prevost M-CC, Moris A, Abastado J-PP, et al. (2006) DC-SIGN facilitates fusion of dendritic cells with human T-cell leukemia virus type 1-infected cells. *Journal of virology* 80: 4771–4780. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.10.4771-4780.2006> PMID: 16641270
- Jain P, Manuel SL, Khan ZK, Ahuja J, Quann K, et al. (2009) DC-SIGN mediates cell-free infection and transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 by dendritic cells. *J Virol* 83: 10908–10921. <https://doi.org/10.1128/JVI.01054-09> PMID: 19692463
- Jones KS, Petrow-Sadowski C, Huang YK, Bertolette DC, Ruscetti FW (2008) Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nat Med* 14: 429–436. <https://doi.org/10.1038/nm1745> PMID: 18376405
- Alais S, Mahieux R, Dutartre H (2015) Viral Source-Independent High Susceptibility of Dendritic Cells to Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection Compared to That of T Lymphocytes. *J Virol* 89: 10580–10590. <https://doi.org/10.1128/JVI.01799-15> PMID: 26269171
- Dutartre H, Claviere M, Journo C, Mahieux R (2016) Cell-Free versus Cell-to-Cell Infection by Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Human T-Lymphotropic Virus Type 1: Exploring the Link among Viral Source, Viral Trafficking, and Viral Replication. *J Virol* 90: 7607–7617. <https://doi.org/10.1128/JVI.00407-16> PMID: 27334587
- Hishizawa M, Imada K, Kitawaki T, Ueda M, Kadowaki N, et al. (2004) Depletion and impaired interferon-alpha-producing capacity of blood plasmacytoid dendritic cells in human T-cell leukaemia virus type I-infected individuals. *Br J Haematol* 125: 568–575. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.04956.x> PMID: 15147371
- Macatonia SE, Cruickshank JK, Rudge P, Knight SC (1992) Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8: 1699–1706. <https://doi.org/10.1089/aid.1992.8.1699> PMID: 1457215
- Makino M, Wakamatsu S, Shimokubo S, Arima N, Baba M (2000) Production of functionally deficient dendritic cells from HTLV-I-infected monocytes: implications for the dendritic cell defect in adult T cell leukemia. *Virology* 274: 140–148. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0445> PMID: 10936095
- Rahman S, Manuel SL, Khan ZK, Wigdahl B, Acheampong E, et al. (2010) Depletion of dendritic cells enhances susceptibility to cell-free infection of human T cell leukemia virus type 1 in CD11c-diphtheria toxin receptor transgenic mice. *J Immunol* 184: 5553–5561. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903226> PMID: 20382884

15. Valeri V, Hryniewicz A, Andresen V, Jones K, Fenizia C, et al. (2010) Requirement of the human T-cell leukemia virus p12 and p30 products for infectivity of human dendritic cells and macaques but not rabbits. *Blood* 116: 3809–3817. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-284141> PMID: 20647569
16. Salvador A, Igartua M, Pedraz JL, Hernandez RM (2012) Dendritic cells interactions with the immune system—implications for vaccine development. *INTECH*.
17. Bangham CR, Ratner L (2015) How does HTLV-1 cause adult T-cell leukaemia/lymphoma (ATL)? *Curr Opin Virol* 14: 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.09.004> PMID: 26414684
18. Iwanaga M, Watanabe T, Yamaguchi K (2012) Adult T-cell leukemia: a review of epidemiological evidence. *Front Microbiol* 3: 322. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00322> PMID: 22973265
19. Banchereau R, Baldwin N, Cepika AM, Athale S, Xue Y, et al. (2014) Transcriptional specialization of human dendritic cell subsets in response to microbial vaccines. *Nat Commun* 5: 5283. <https://doi.org/10.1038/ncomms6283> PMID: 25335753
20. Tanaka Y, Yoshida A, Takayama Y, Tsujimoto H, Tsujimoto A, et al. (1990) Heterogeneity of antigen molecules recognized by anti-tax1 monoclonal antibody Lt-4 in cell lines bearing human T cell leukemia virus type I and related retroviruses. *Jpn J Cancer Res* 81: 225–231. PMID: 2161813
21. Pais-Correia AM, Sachse M, Guadagnini S, Robbiati V, Lasserre R, et al. (2010) Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat Med* 16: 83–89. <https://doi.org/10.1038/nm.2065> PMID: 20023636
22. Uze G, Di Marco S, Mouchel-Vielh E, Monneron D, Bandu MT, et al. (1994) Domains of interaction between alpha interferon and its receptor components. *J Mol Biol* 243: 245–257. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1651> PMID: 7932753
23. Cachat A, Chevalier SA, Alais S, Ko NL, Ratner L, et al. (2013) Alpha interferon restricts human T-lymphotropic virus type 1 and 2 de novo infection through PKR activation. *J Virol* 87: 13386–13396. <https://doi.org/10.1128/JVI.02758-13> PMID: 24089560
24. Chevalier SA, Turpin J, Cachat A, Afonso PV, Gessain A, et al. (2014) Gem-induced cytoskeleton remodeling increases cellular migration of HTLV-1-infected cells, formation of infected-to-target T-cell conjugates and viral transmission. *PLoS Pathog* 10: e1003917. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003917> PMID: 24586148
25. Lambert S, Bouttier M, Vassy R, Seigneuret M, Cari P-S, et al. (2009) HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. *Blood* 113: 5176–5185. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-150342> PMID: 19270265
26. Jia X, Zhao Q, Xiong Y (2015) HIV suppression by host restriction factors and viral immune evasion. *Curr Opin Struct Biol* 31: 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.04.004> PMID: 25939065
27. Kinpara S, Kijiyama M, Takamori A, Hasegawa A, Sasada A, et al. (2013) Interferon-alpha (IFN-alpha) suppresses HTLV-1 gene expression and cell cycling, while IFN-alpha combined with zidovudine induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-1-infected cells. *Retrovirology* 10: 52. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-52> PMID: 23688327
28. Harper MS, Guo K, Gibbert K, Lee EJ, Dillon SM, et al. (2015) Interferon-alpha Subtypes in an Ex Vivo Model of Acute HIV-1 Infection: Expression, Potency and Effector Mechanisms. *PLoS Pathog* 11: e1005254. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005254> PMID: 26529416
29. Kerr MC, Teasdale RD (2009) Defining macropinocytosis. *Traffic* 10: 364–371. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00878.x> PMID: 19192253
30. Alloati A, Kotsias F, Magalhaes JG, Amigorena S (2016) Dendritic cell maturation and cross-presentation: timing matters! *Immunol Rev* 272: 97–108. <https://doi.org/10.1111/imr.12432> PMID: 27319345
31. Kijewski SD, Gummuluru S (2015) A mechanistic overview of dendritic cell-mediated HIV-1 trans infection: the story so far. *Future Virol* 10: 257–269. <https://doi.org/10.2217/fvl.15.2> PMID: 26213560
32. Sewald X, Ladinsky MS, Uchil PD, Beloor J, Pi R, et al. (2015) Retroviruses use CD169-mediated trans-infection of permissive lymphocytes to establish infection. *Science* 350: 563–567. <https://doi.org/10.1126/science.aab2749> PMID: 26429886
33. Macatonia S, Cruickshank J, Rudge P, Knight S (1992) Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS research and human retroviruses* 8: 1699–1706. <https://doi.org/10.1089/aid.1992.8.1699> PMID: 1457215
34. van Boxel-Dezaire AH, Rani MR, Stark GR (2006) Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity* 25: 361–372. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.014> PMID: 16979568
35. van Boxel-Dezaire AH, Zula JA, Xu Y, Ransohoff RM, Jacobberger JW, et al. (2010) Major differences in the responses of primary human leukocyte subsets to IFN-beta. *J Immunol* 185: 5888–5899. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902314> PMID: 20956346

36. Hilkens CM, Schlaak JF, Kerr IM (2003) Differential responses to IFN-alpha subtypes in human T cells and dendritic cells. *J Immunol* 171: 5255–5263. PMID: 14607926
37. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, et al. (2011) A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472: 481–485. <https://doi.org/10.1038/nature09907> PMID: 21478870
38. Cachat A, Alais S, Chevalier SA, Journo C, Fusil F, et al. (2014) ADAR1 enhances HTLV-1 and HTLV-2 replication through inhibition of PKR activity. *Retrovirology* 11: 93. <https://doi.org/10.1186/s12977-014-0093-9> PMID: 25389016
39. Pique C, Lagaudrière-Gesbert C, Delamarre L, Rosenberg AR, Conjeaud H, et al. (2000) Interaction of CD82 Tetraspanin Proteins with HTLV-1 Envelope Glycoproteins Inhibits Cell-to-Cell Fusion and Virus Transmission. *Virology* 276: 455–465. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0538> PMID: 11040136
40. Li K, Zhang S, Kronqvist M, Wallin M, Ekstrom M, et al. (2008) Intersubunit disulfide isomerization controls membrane fusion of human T-cell leukemia virus Env. *J Virol* 82: 7135–7143. <https://doi.org/10.1128/JVI.00448-08> PMID: 18480461
41. Bosch B, Grigorov B, Senserrich J, Clotet B, Darlix JL, et al. (2008) A clathrin-dynamin-dependent endocytic pathway for the uptake of HIV-1 by direct T cell-T cell transmission. *Antiviral Res* 80: 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.06.004> PMID: 18602423
42. Hubner W, McNerney GP, Chen P, Dale BM, Gordon RE, et al. (2009) Quantitative 3D video microscopy of HIV transfer across T cell virological synapses. *Science* 323: 1743–1747. <https://doi.org/10.1126/science.1167525> PMID: 19325119
43. Sloan RD, Kuhl BD, Mesplede T, Munch J, Donahue DA, et al. (2013) Productive entry of HIV-1 during cell-to-cell transmission via dynamin-dependent endocytosis. *J Virol* 87: 8110–8123. <https://doi.org/10.1128/JVI.00815-13> PMID: 23678185
44. Dale BM, McNerney GP, Thompson DL, Hubner W, de Los Reyes K, et al. (2011) Cell-to-cell transfer of HIV-1 via virological synapses leads to endosomal virion maturation that activates viral membrane fusion. *Cell Host Microbe* 10: 551–562. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.015> PMID: 22177560
45. Zhang X, Meng Z, Qiu S, Xu Y, Yang D, et al. (2009) Lipopolysaccharide-induced innate immune responses in primary hepatocytes downregulates woodchuck hepatitis virus replication via interferon-independent pathways. *Cell Microbiol* 11: 1624–1637. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01353.x> PMID: 19573162
46. Platt CD, Ma JK, Chalouni C, Ebersold M, Bou-Reslan H, et al. (2010) Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 4287–4292. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910609107> PMID: 20142498
47. Canton J, Schlam D, Breuer C, Gutschow M, Glogauer M, et al. (2016) Calcium-sensing receptors signal constitutive macropinocytosis and facilitate the uptake of NOD2 ligands in macrophages. *Nat Commun* 7: 11284. <https://doi.org/10.1038/ncomms11284> PMID: 27050483
48. Raposo G, Moore M, Innes D, Leijendekker R, Leigh-Brown A, et al. (2002) Human Macrophages Accumulate HIV-1 Particles in MHC II Compartments. *Traffic*.
49. Jouve M, Sol-Foulon N, Watson S, Schwartz O, Benaroch P (2007) HIV-1 Buds and Accumulates in “Nonacidic” Endosomes of Macrophages. *Cell Host & Microbe* 2: 85–95.
50. Gaudin R, Berre S, Cunha de Alencar B, Decalf J, Schindler M, et al. (2013) Dynamics of HIV-containing compartments in macrophages reveal sequestration of virions and transient surface connections. *PLoS One* 8: e69450. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069450> PMID: 23922713
51. Benaroch P, Billard E, Gaudin R, Schindler M, Jouve M (2010) HIV-1 assembly in macrophages. *Retrovirology* 7: 29. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-7-29> PMID: 20374631
52. Pelchen-Matthews A, Kramer B, Marsh M (2003) Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol* 162: 443–455. <https://doi.org/10.1083/jcb.200304008> PMID: 12885763
53. Welsch S, Groot F, Krausslich HG, Keppler OT, Sattentau QJ (2011) Architecture and regulation of the HIV-1 assembly and holding compartment in macrophages. *J Virol* 85: 7922–7927. <https://doi.org/10.1128/JVI.00834-11> PMID: 21613397
54. Kramer B, Pelchen-Matthews A, Deneka M, Garcia E, Pignet V, et al. (2005) HIV interaction with endosomes in macrophages and dendritic cells. *Blood Cells Mol Dis* 35: 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.06.006> PMID: 16087369
55. Finzi A, Brunet A, Xiao Y, Thibodeau J, Cohen EA (2006) Major histocompatibility complex class II molecules promote human immunodeficiency virus type 1 assembly and budding to late endosomal/multivesicular body compartments. *Journal of virology* 80: 9789–9797. <https://doi.org/10.1128/JVI.01055-06> PMID: 16973583
56. Finzi A, Perlman M, Bourgeois-Daigneault MC, Thibodeau J, Cohen EA (2013) Major histocompatibility complex class-II molecules promote targeting of human immunodeficiency virus type 1 virions in late

- endosomes by enhancing internalization of nascent particles from the plasma membrane. *Cell Microbiol* 15: 809–822. <https://doi.org/10.1111/cmi.12074> PMID: 23170932
57. van Montfoort N, Olgagnier D, Hiscott J (2014) Unmasking immune sensing of retroviruses: interplay between innate sensors and host effectors. *Cytokine Growth Factor Rev* 25: 657–668. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.08.006> PMID: 25240798
  58. Barroca P, Calado M, Azevedo-Pereira JM (2014) HIV/dendritic cell interaction: consequences in the pathogenesis of HIV infection. *AIDS Rev* 16: 223–235. PMID: 25350531
  59. Izquierdo-Useros N, Blanco J, Erkizia I, Fernandez-Figueras MT, Borrás FE, et al. (2007) Maturation of blood-derived dendritic cells enhances human immunodeficiency virus type 1 capture and transmission. *J Virol* 81: 7559–7570. <https://doi.org/10.1128/JVI.02572-06> PMID: 17475656
  60. Cote SC, Plante A, Tardif MR, Tremblay MJ (2013) Dectin-1/TLR2 and NOD2 agonists render dendritic cells susceptible to infection by X4-using HIV-1 and promote cis-infection of CD4(+) T cells. *PLoS One* 8: e67735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067735> PMID: 23844079
  61. Rahman S, Khan ZK, Wigdahl B, Jennings SR, Tangy F, et al. (2011) Murine FLT3 ligand-derived dendritic cell-mediated early immune responses are critical to controlling cell-free human T cell leukemia virus type 1 infection. *J Immunol* 186: 390–402. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002570> PMID: 21115731

Review

# HTLV-1, the Other Pathogenic Yet Neglected Human Retrovirus: From Transmission to Therapeutic Treatment

Nicolas Futsch <sup>1,2</sup>, Renaud Mahieux <sup>1,2</sup> and Hélène Dutartre <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> International Center for Research in Infectiology, Retroviral Oncogenesis Laboratory, INSERM U1111—Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon, F-69007 Lyon, France; nicolas.futsch@ens-lyon.fr (N.F.); renaud.mahieux@ens-lyon.fr (R.M.)

<sup>2</sup> Equipe labellis e “Ligue Nationale Contre le Cancer”, France

\* Correspondence: helene.dutartre@ens-lyon.fr

Received: 30 November 2017; Accepted: 18 December 2017; Published: 21 December 2017

**Abstract:** Going back to their discovery in the early 1980s, both the Human T-cell Leukemia virus type-1 (HTLV-1) and the Human Immunodeficiency Virus type-1 (HIV-1) greatly fascinated the virology scene, not only because they were the first human retroviruses discovered, but also because they were associated with fatal diseases in the human population. In almost four decades of scientific research, both viruses have had different fates, HTLV-1 being often upstaged by HIV-1. However, although being very close in terms of genome organization, cellular tropism, and viral replication, HIV-1 and HTLV-1 are not completely commutable in terms of treatment, especially because of the opposite fate of the cells they infect: death versus immortalization, respectively. Nowadays, the antiretroviral therapies developed to treat HIV-1 infected individuals and to limit HIV-1 spread among the human population have a poor or no effect on HTLV-1 infected individuals, and thus, do not prevent the development of HTLV-1-associated diseases, which still lack highly efficient treatments. The present review mainly focuses on the course of HTLV-1 infection, from the initial infection of the host to diseases development and associated treatments, but also investigates HIV-1/HTLV-1 co-infection events and their impact on diseases development.

**Keywords:** HTLV-1; HIV-1; viral transmission; ATLL; TSP/HAM; treatments

## 1. Introduction

Human T-cell Leukemia Virus type-1 (HTLV-1) was first described by Robert Gallo’s team in 1980 [1,2], before the discovery of Human Immunodeficiency Virus type-1 (HIV-1) [3]. HTLV-1 and HIV-1 are both retroviruses that emerged in human populations after zoonotic transmission from simian populations [4,5]. The number of HTLV-1-infected people was first estimated between 10–20 million people [6], and more recently between 5–10 million, even if the authors state that this number is likely underestimated [7]. HTLV-1 is not evenly distributed around the world but is found in highly endemic areas, such as Japan, sub-Saharan Africa, the Caribbean region and South America. Smaller infection foci are located in the Middle East, in Romania and in Australo-Melanesia [7]. In comparison, 37 million people are infected by HIV-1 worldwide, with the highest prevalence sites found in central- and South Africa [8], followed by the Caribbean region, Latin America, South-East Asia and Eastern Europe [9]. HTLV-1 and HIV-1 both lead to chronic infection. HTLV-1 infection may lead to the development of two main diseases: a malignant lymphoproliferation named Adult T-cell Leukemia/Lymphoma (ATLL) and a chronic progressive myelopathy named Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1 Associated Myelopathy (TSP/HAM). Other inflammatory syndromes linked to HTLV-1 infection were also reported. Approximately

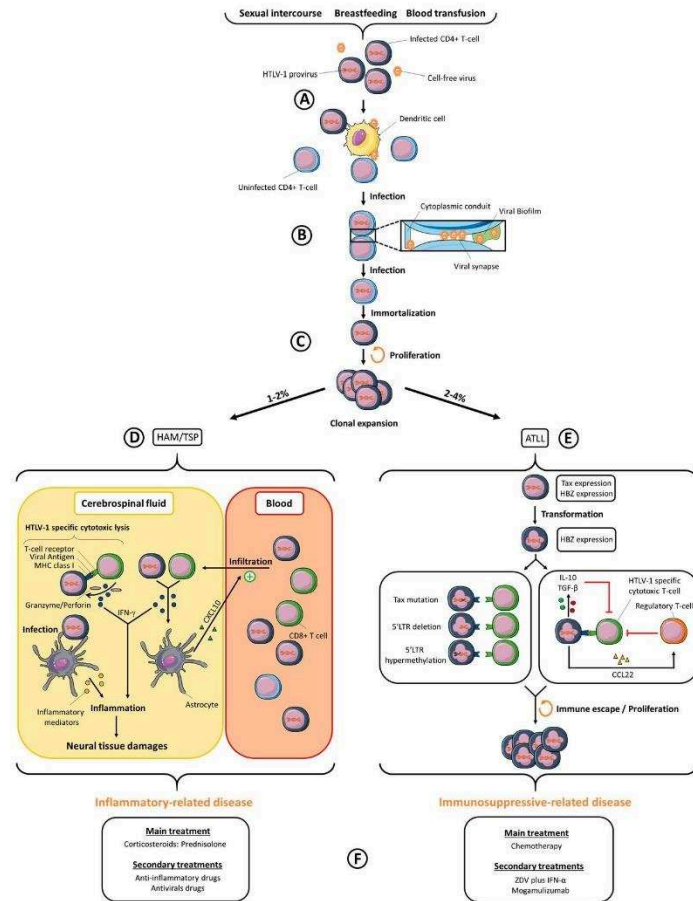
2 to 4% of HTLV-1 infected individuals will develop an ATLL and 1 to 2% a TSP/HAM. HIV-1 is the etiological agent of an Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) that appears in most chronically infected people, independently of their age at the onset of infection, and which is fatal in the absence of treatment. Antiretroviral therapies (ART) have undergone great improvements during the last decades, notably by reducing or suppressing HIV-1 replication (and thus HIV-1 viral load) and by lowering the risk of developing AIDS [8]. Unfortunately, HTLV-1-infected people do not benefit from such efficient therapies yet: only symptomatic individuals are treated, with inconsistent benefits. This review will focus on the mechanisms of HTLV-1 viral transmission, HTLV-1-linked symptoms and their current treatments, drug development against HTLV-1 (summarized in Figure 1), but also on HIV-1/HTLV-1 co-infection.

## 2. Inter-Individual Viral Transmission

HTLV-1 inter-individual transmission has been associated with three main modalities: a vertical transmission from mother-to-child that occurs after prolonged breast-feeding [10], non-protected sexual intercourse [11] and contamination with blood products [12]. However, with systematic HTLV-1 antibody screening during blood collection and transfusion, initially established in Japan in 1986 and then in the United States of America, France, the Netherlands, Sweden, Portugal, Denmark, Greece, Ireland, Romania and the United Kingdom, the number of new HTLV-1 infections has significantly decreased. Even if these systematic controls are efficient in preventing HTLV-1 blood transmission, the cost-effectiveness of this strategy remains a debate in countries with a low prevalence [13]. From that perspective, other preventive options have been implemented. Because free viral particles are hardly found in the plasma of HTLV-1 infected individuals [14], the viral agent leading to inter-individual spread is presumably infected cells themselves. The nature of these cells is not fully confirmed, but they are likely to be CD4+ T-cells or macrophages [15]. It is estimated that HTLV-1 transmission linked to blood transfusion requires at least 90,000 HTLV-1-infected cells to promote infection in the recipient [16]. Thus, leukocyte reduction under this threshold would limit HTLV-1 incidence via blood transfusion. To limit HTLV-1 infection by prolonged breast-feeding or sexual intercourse, prevention policies and health advertisings have emerged. For example, HTLV-1 antibody screening of pregnant women, and further refraining breastfeeding by seropositive women, induced an efficient reduction in HTLV-1 mother-to-child transmission in Japan [17]. HIV-1 shares common entry routes with HTLV-1: HIV-1 is transmitted by parenteral exposure (blood transfusion, drugs injection), during sexual intercourse and by vertical transmission. However, in contrast to HTLV-1, HIV-1 transmission from mother-to-child also occurs during pregnancy, labor and delivery, in addition to breastfeeding. Several preventive strategies are available to limit HIV-1 transmission. Condom use, medical circumcision, pre-exposure ART and post-exposure ART (until 72 h after sexual intercourse) have greatly limited the risks of HIV-1 sexual transmission. ART of HIV-1 seropositive women and use of clean injection equipment have also effectively reduced newborn infection and parenteral transmission, respectively [8].

## 3. Cellular Transmission of HTLV-1

In infected individuals, HTLV-1 proviral DNA, i.e., HTLV-1 full-length integrated viral genome, is mainly found in activated CD4+ T-cells [18]. In addition, proviral DNA is also detected, but to a lesser extent, in other immune cell types, including CD8+ T-cells, B cells, monocytes, or dendritic cells [19–21]. HIV-1 shares a common *in vivo* tropism with HTLV-1, since CD4+ T-cells are major targets of HIV-1 infection. *In vivo*, latent HIV-1 proviruses are found in memory CD4+ T-cells, monocytes and macrophages, thus constituting viral reservoirs [22,23]. *In vivo* HIV-1 infection of dendritic cells has only rarely been reported [24,25] and blood dendritic cells do not seem to be targeted. Both viruses are nevertheless able to interact with dendritic cells *in vitro*, and this interaction, which may occur before T-cell infection *in vivo*, has been suggested as an important step for the subsequent infection of T-cells and further viral spread [26] (Figure 1A).



**Figure 1.** The course of HTLV-1 (Human T-cell Leukemia Virus type-1) infection. (A) HTLV-1 transmission through sexual intercourse, breastfeeding or contaminated blood products will allow the dissemination of HTLV-1 infected cells at the vicinity of dendritic cells, which are then able to transmit HTLV-1 viruses to CD4+ T-cells; (B) Neo-infection of CD4+ T-cells, which requires a cell-cell contact between an infected and a non-infected T-cell, is achieved through cellular conduits, the viral synapse or the viral biofilm; (C) Tax expression in HTLV-1 infected cells will result in consequent cell signaling alterations, such as continuous proliferation and apoptosis inhibition. Immortalized HTLV-1 infected cells will then proliferate through mitotic divisions, also known as clonal expansion; (D) TSP/HAM (Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1 Associated Myelopathy) is an inflammatory-related disease, which appears in 1 to 2% of infected individuals. The production of IFN- $\gamma$  (Interferon- gamma), by HTLV-1 infected cells and HTLV-1 specific cytotoxic cells infiltrated in the cerebrospinal fluid, will lead to neural tissue damages, both directly by exacerbating inflammatory responses and indirectly by recruiting more IFN- $\gamma$  producing cells in the CSF (Cerebrospinal fluid) through CXCL10 (C-X-C motif chemokine ligand 10) expression by astrocytes. (E) ATLL (Adult T-cell Leukemia/Lymphoma) is an immunosuppressed-related disease, which appears in 2 to 4% of infected individuals. The accumulation of genetic alterations in HTLV-1 infected T-cells leads to their transformation, and subsequent loss of Tax expression, either by mutations in the *Tax* gene or genetic modifications of the proviral 5' LTR (Long Terminal Repeat). HTLV-1 transformed cells can escape from CTL (Cytotoxic T-cell) responses, through the loss of viral antigens presentation to the T-cell receptor, the production of Th1 (T-helper 1) inhibitory cytokines, and the recruitment of regulatory T-cells via CCL22 (C-C motif chemokine ligand 22) expression; (F) Current options to treat patients with TSP/HAM or ATLL.

HTLV-1 and HIV-1 viral particles have been morphologically described [27]. Contrary to HIV-1 mature virions that harbor cone-shaped capsids, HTLV-1 mature virions show poorly defined polyhedral capsids, comprising both angular polygon-like and single-curved regions [27]. Differences are also observed in the trafficking of the structural Gag protein from both viruses, since HTLV-1 Gag is targeted to the plasma membrane at low concentration, whereas HIV-1 Gag first concentrates in the cytoplasm before being directed to the plasma membrane [28]. Although HTLV-1 infected cells are able to produce viruses when cultured *in vitro*, very few viral particles are found *in vivo*, as previously mentioned, and HTLV-1 cell-free virions are poorly infectious, except towards dendritic cells [26,29,30], probably because these cells are more susceptible than T-cells to HTLV-1 infection [29]. HTLV-1 viral particles infectivity has a very short half-life of 0.6 h at 37 °C, partly due to the sensitivity of HTLV-1 envelope proteins to this reduction [31,32]. In addition, recombinant HTLV-1 viruses pseudotyped with VSV-G envelope proteins are still less infectious than recombinant HIV-1 viruses pseudotyped with the same envelope [33]. This suggests that the low infectivity of HTLV-1 cell-free viral particles is not only associated with the instability of its envelope protein, but also to the intrinsic properties of the core particle itself and/or to post-entry events. In fact, efficient HTLV-1 viral transmission requires tight contacts between an infected cell and a target cell [34]. Although HIV-1 cell-free virions are competent in the infection of target cells, cell-to-cell transmission is also more efficient than infection with cell-free virus and probably represents the main mechanism of HIV-1 spread *in vivo* [35].

*In vitro*, three cell-to-cell transmission mechanisms have been reported so far for HTLV-1: the viral synapse [36], the viral biofilm [37] and the cellular conduits [38] (Figure 1B). The viral synapse is defined as a virtual space in which viral particles are budding, resulting in their accumulation close to an uninfected cell's plasma membrane [36]. The HTLV-1 Tax protein plays a significant role in the viral synapse formation, since Tax co-localizes at the microtubule-organizing center (MTOC) [39], and it up-regulates, among others, the expression of ICAM-1 (Inter Cellular Adhesion Molecule 1) [40,41], whose interaction with LFA-1 (Lymphocyte Function-associated antigen 1) on a non-infected cell favors cell-cell adhesion and reorientation of the MTOC at the site of cell-cell contact, where viral assembly is thus polarized [42]. Interestingly, HIV-1 infected cells also tend to enhance cell-cell adhesions, a process which increases viral dissemination between T-cells through viral synapses [43,44]. The viral biofilm consists of HTLV-1 viral particles retained at the infected T-cell surface by extracellular-matrix proteins, such as collagen and agrin, and other cellular proteins, such as tetherin and galectin-3. The removal of this structure from an infected cell almost abolishes viral transmission, thus suggesting that it plays a more efficient role than viral synapse for transmitting HTLV-1 [37]. Indeed, isolated biofilm purified from HTLV-1 infected cells is infectious, in contrast to HTLV-1 particles released in the supernatant of the same cells [29]. More than just a very efficient cell-to-cell transmission pathway, it is proposed that the viral biofilm could prevent recognition by antibodies by masking HTLV-1 epitopes. Viral biofilm structures were also observed in infected cells from patients after *in vitro* culture [37]. HIV-1 accumulation has also been observed near the surface of infected cells [45] in structures that were proposed as budding platforms, and that polarized toward the cell-cell contact [46], thus allowing viral transfer at the viral synapse [43,47]. One can thus hypothesize that HIV-1 accumulation could occur at the surface of infected cells in structures that could be defined as a viral biofilm, although this has not been published yet. Cellular conduits are an expansion of filopodium-like structures towards neighboring cells [48]. These conduits are also induced by the HTLV-1 regulatory p8 protein expression [38]. In addition, p8 induces LFA-1 clustering at the cell surface, which results in better cell-cell adhesion between infected and uninfected cells through ICAM-1/LFA-1 interactions, but also favors the number and the length of cellular conduits [38]. HTLV-1 viral particles were identified at the junction of conduits with uninfected cells. Cellular conduits could then act both in stabilizing cell-cell contacts and in developing poly-synapses. HIV-1 uses similar mechanisms, since cell-cell transmission relies on filopodes, nanotubes and polysynapses, in addition to the viral



synapse [45,49]. It was suggested that those mechanisms are mainly induced by the HIV-1 regulatory Nef protein [50].

#### 4. Viral Dissemination

In vivo, HTLV-1 spread occurs through two mechanisms: neo-infection (the mechanisms of which were described above) or clonal expansion of infected cells [51]. Clonal expansion is believed to follow neo-infection (Figure 1C) and consists of mitotic divisions of HTLV-1 infected T-cells, which are immortalized by the expression of HTLV-1 oncoprotein Tax [52]. Interestingly when chronic infection has been established, viral replication is repressed either by direct inactivation of the viral genome [51], by cytotoxic immune responses targeting infected-cells [53] or by the indirect action of type I IFN (Interferon) produced by stromal cells [54] and able to inhibit the expression of viral proteins [54,55]. Furthermore, infected cells express tetherin [56], an IFN-induced gene that retains viral particles at the surface of infected cells, thus reducing the amount of particles released in the supernatant. All these processes probably contribute to the absence of cell-free viral particles in body fluids. Clonal proliferation of HTLV-1 infected cells thus remains the dominant contributor of HTLV-1 spread in vivo, since treatment of TSP/HAM patients with zidovudine and lamivudine, two reverse transcriptase inhibitors, does not reduce HTLV-1 proviral load [57]. Interestingly, 1- or 2-LTR DNA circles, which reflect active HTLV-1 replication, are detected both in asymptomatic HTLV-1 carriers and in symptomatic patients, suggesting that viral replication is nonetheless maintained at low levels during the whole course of infection [58]. Several mechanisms could contribute to the lack of zidovudine effects on TSP/HAM patients proviral load [55,59–61]. First, neo-infection could only represent rare and isolated events. Second, the high number of viral particles transmitted through cell-cell contact could circumvent antiviral therapy efficiency, as observed for HIV-1 [62]. Finally, HTLV-1-infected cells can be found in organs that are poorly targeted by antivirals, such as lymph nodes [63], thymus [64], or bone marrow after the infection of bone-marrow hematopoietic stem cells [65], thus allowing persistent replication even under active retroviral treatment, as observed in HIV-1 infection [66].

In three recipients who acquired HTLV-1 infection following transplantation from an HTLV-1 infected donor, kinetics of early HTLV-1 infection suggested that neo-infection and clonal expansion [67] occurred in parallel [68]. However, it is worth noting that both therapeutic immune suppression inherent to the transplantation procedure, which might have favored neo-infection, and rapid administration of ART to transplantation-acquired HTLV-1 infected patients, which might have favored clonal expansion, have probably disturbed the balance between infectious spread and mitotic proliferation in these patients.

Dendritic cells are believed to play a significant role in the initial steps of HTLV-1 dissemination. Not only are dendritic cells more sensitive to HTLV-1 infection than autologous T-cells [29], they are also able to transmit HTLV-1 viruses to autologous CD4+ T-cells [30], possibly via DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) [69]. Even though mature dendritic cells are less susceptible to HTLV-1 infection and less prone to transfer HTLV-1 to T-cells than their immature counterpart [70], mature dendritic cells from infected patients are able to stimulate proliferation of autologous T-cells [71–73], thus probably sustaining clonal expansion. The significant role of dendritic cells in HTLV-1 spread has also been demonstrated in different animal models. First, the infection of mice depleted from dendritic cells with a recombinant HTLV-1 virus pseudo-typed with the murine leukemia virus (MLV) envelop showed lower HTLV-1 proviral load, compared to infection of mice without depletion of dendritic cells [73]. Secondly, infection of macaques with HTLV-1 viruses unable to infect dendritic cells, due to mutations in the regulatory p8 and p12 proteins, led to poor seroconversion rates [74].

Transfer of HTLV-1 virus from dendritic cells to CD4+ T-cells or between CD4+ T-cells themselves through neo-infection mechanisms generates several infected CD4+ T-cell clones, each clone being defined by a unique integration site of HTLV-1 provirus within the host genome.

Tax-mediated immortalization of HTLV-1 infected T-cells, and their subsequent mitotic divisions, will lead to the presence of expanded clones of HTLV-1 infected T-cells in infected individuals, which may persist for decades [75]. Even though the mechanisms regulating HTLV-1 clonality in vivo, i.e., determining the diversity of infected cells with different HTLV-1 integration sites, are not fully understood, oligoclonal expansion rather than monoclonal expansion of a given infected cell, could predispose to HTLV-1-associated diseases [63]. Furthermore, several factors other than clonality index are potentially involved in HTLV-1-associated diseases development, including proviral load itself, the number of infected cells transmitted from one individual to another one, or the immune response. In addition, a retrospective study suggested that HTLV-1-associated diseases are not only sporadic events but also sometimes cluster in families [76], highlighting the role of environmental and genetic factors in disease development. Interestingly, individuals who acquired HTLV-1 through blood transfusion are more likely to develop TSP/HAM [77], while individuals who acquired the virus during breastfeeding are more likely to develop ATLL [78].

## 5. HTLV-1-Associated Diseases

### 5.1. ATLL

ATLL was described before HTLV-1 discovery [79], but the link between HTLV-1 infection and the disease was prompted only two years after HTLV-1 discovery [2]. ATLL is defined as a highly aggressive malignancy of HTLV-1 infected CD4+ T-cells that develops after long-term chronic infection (Figure 1E). It is classified into four clinical subtypes, described as smoldering, chronic, acute, and lymphoma subtypes [80]. This classification relies on a wide array of diagnostic criteria such as lymphadenopathy, splenomegaly, hepatomegaly, hypercalcemia, skin and pulmonary lesions or organs infiltration. Acute and lymphoma subtypes are more aggressive than smoldering and chronic subtypes, with a median survival time of approximately 9.5 months *versus* 43 months, respectively [81]. In addition, acute and lymphoma subtypes represent 60% and 20% of all ATLL subtypes, respectively [82]. Symptoms are numerous, and mostly depend upon ATLL subtype. Abdominal pain, diarrhea, ascites, jaundice, pleural effusion, cough, sputum, fever, unconsciousness states and/or opportunistic infections are common features associated with ATLL in patients. Leukemic cells possess an unusual morphology, with flower-like shaped nuclei [79]. Their phenotype is characterized by expression of CD2, CD3, CD4, CD5, CD25, CCR4 (C-C chemokine receptor type 4) but not of CD7 [83–85]. CADM1 (Cell Adhesion Molecule 1) is also highly expressed in ATLL cells, with a potential effect on cell-cell adhesion, tumor growth and organ infiltration [86]. These proteins constitute good biomarkers to evaluate ATLL progression, since CD7 down-regulation on HTLV-1-infected cells reflects disease progression during the course of the infection [87]. Another receptor, CCR7 (C-C chemokine receptor type 7), is a hallmark of ATLL aggressiveness, since it is only expressed on cells from aggressive subtypes [84].

Leukemogenesis results from several events that contribute to transformation of HTLV-1 infected T-cells. Mechanisms suspected to play a role in HTLV-1-induced leukemogenesis include differential mRNA expression, up-regulation and down-regulation of numerous micro-RNAs, cell-signaling alterations, somatic mutations, epigenetic deregulations or aneuploidy [88–91]. The Tax viral protein plays an important role in these processes. First, Tax is able to modulate viral and cellular gene expression by activating CREB (cAMP response element-binding protein)/ATF (Activating transcription factor), SRF (serum response factor) and NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) dependent pathways [92,93]. Second, Tax prevents cell-cycle arrest and inhibits both DNA damage repair and apoptosis pathways. Thus, Tax favors both the proliferation of infected cells and the accumulation of genetic alterations. Finally, Tax has been shown to induce transformation of rodent fibroblasts [94,95], but also cell transformation in transgenic *Drosophila melanogaster* and mice expressing Tax [96,97]. Even though the expression of Tax alone seems sufficient for immortalization, Tax poorly transforms human T-cells [98]. As transformation of primary human lymphocytes by HTLV-1 is nevertheless

possible [99], several HTLV-1 proteins probably synergize to induce T-cell transformation and further development of ATLL. Indeed, HBZ (HTLV-1 basic leucine zipper factor) transgenic mice develop T-cell lymphomas [100], thus demonstrating that HBZ also participates in the mechanism of HTLV-1 dependent cellular transformation. Numerous ATLL cells often present mutations in the *tax* gene [101] as well as hypermethylation or deletion of the provirus 5' LTR (Long Terminal Repeat) [102,103], which normally drives transcription of HTLV-1 viral genes encoded by the positive strand, including *tax* (Figure 1E). In contrast, the HBZ-encoding gene, the transcription of which is driven by the 3' LTR, is consistently expressed in all ATLL cases [104]. Interestingly, via its protein or its mRNA, HBZ promotes T-cell proliferation, suppresses Tax-mediated viral transcription through the 5' LTR, inhibits NF- $\kappa$ B activity, apoptosis and autophagy, disrupts host genomic integrity through miRNA expression and impairs Th1 (T-helper 1) mediated antiviral immune response [105–107]. However, although it has numerous functions, HBZ does not support productive HTLV-1 replication, but rather appears to participate in HTLV-1-induced transformation and to facilitate HTLV-1 infected cells persistence. Thus, Tax and HBZ cooperate in the transformation of infected CD4+ T-cells. Indeed, HBZ induces T-cells to become Tregs, especially by up-regulating Foxp3 expression [108]. Interestingly, human CD4+ Foxp3+ cells can both be immortalized and transformed after expression of Tax [109], thus suggesting that Tax oncogenic properties in human cells may also require at least HBZ activity. In addition, immune responses are deregulated, especially through the induction of a tolerogenic state [110,111], either via the direct action of the anti-inflammatory cytokines IL-10 (Interleukin-10) [112] and TGF- $\beta$  (Transforming growth factor-beta) [113] produced by infected cells themselves or via the indirect action of CCL22 (C-C motif chemokine ligand 22) produced by infected cells [114], which allows the recruitment of Tregs and the inhibition of HTLV-1-specific cytotoxic T-cell (CTL) responses [115] (Figure 1E). Furthermore, although Tax is highly immunogenic in infected individuals, especially through the Tax (11–19) epitope [116], Tax expression is lacking in most ATLL cells, allowing their escape from Tax-specific CTL responses in ATLL patients.

Regardless of the precise mechanism of human T-cells transformation, HTLV-1 remains one of the most human oncogenic viruses [117]. Mechanisms by which a virus causes cancer can widely differ. Even though HTLV-1 regulatory proteins Tax and HBZ have oncogenic properties, as described above, alterations of the infected cell micro-environment could also play a role in cancer development. Indeed, viral oncogenesis follows chronic infection, which indicates that oncoviruses are able to escape from host immune responses. Furthermore, a dampened chronic inflammatory response [118] could result in immunosuppression and thus favor cancer development.

## 5.2. TSP/HAM

In 1985, the association between HTLV-1 infection and TSP/HAM development was described in Martinique, a French department located in the Caribbean [119]. At that time, almost 60% of TSP patients were shown to be seropositive for several HTLV-1 antigens. Soon afterwards, another study highlighted the link between HTLV-1 infection and HAM in Japan [120]. It was further shown that TSP and HAM were the same disease, thus called TSP/HAM. TSP/HAM is a chronic inflammatory disease of the central nervous system. It is characterized by a progressive spastic weakness of the lower limbs, lower back pain, and bowel and bladder dysfunctions. Spinal cord lesions and myelin loss, characteristic of TSP/HAM, could be induced by direct viral cytopathic effects, by immune-mediated reactions or both. In vitro infection of astrocytes by HTLV-1 induces the secretion of pro-inflammatory cytokines that are thought to contribute to the occurrence of neuronal lesions. Other studies report an accumulation of HTLV-1-specific CTLs within cerebrospinal fluid (CSF) [121,122]. Inflammatory products released by those cells, such as IFN- $\gamma$  (Interferon- gamma), may damage neighboring glial cells, neurons or astrocytes. The role of HTLV-1-specific CTLs in infected individuals is therefore quite ambiguous: on one side, these cells directly kill HTLV-1 infected cells but on the other side, their chronic release of inflammatory cytokines could have a detrimental side effect. It is also worth noting that an efficient HTLV-1-specific CTL response relies on HLA

(Human Leukocyte Antigen) class I genotype specificity. Indeed, the presence of *HLA-A\*02* allele in the southern Japanese population is associated with a lower proviral load and a lower risk of TSP/HAM, whereas the *HLA-B\*54* allele is associated with a higher risk of TSP/HAM [123].

HTLV-1-infected CD4+ T-cells also accumulate in TSP/HAM patients CSF and are able to produce IFN- $\gamma$  [124]. Interestingly, IFN- $\gamma$  stimulates CXCL10 (C-X-C motif chemokine ligand 10) production by astrocytes, an inflammatory chemokine that will favor leukocyte homing to inflamed tissues. Thus, CXCL10 secretion by astrocytes may enhance the infiltration of HTLV-1 infected CD4+ T-cells and HTLV-1 specific CTLs in the CSF, triggering an inflammatory positive feedback loop [125] (Figure 1D). In this model, TSP/HAM results from detrimental interactions occurring between the central nervous system and the immune system. Interestingly, a specific IFN-inducible signature is observed in all blood immune cells from TSP/HAM patients and not in cells from infected yet asymptomatic individuals or from patients suffering from other inflammatory diseases such as systemic lupus erythematosus or multiple sclerosis. This reflects a complex deregulation of IFN production in vivo that could be more likely linked to disease development rather than protection from viral infection [126]. In addition, since this IFN-inducible signature is supported by the production of both type-II (i.e., IFN- $\gamma$ ) and type-I IFN, it also opens the debate regarding a beneficial antiviral or detrimental role of type-I IFN in HTLV-1 infection and symptoms development.

### 5.3. Other Syndromes

Apart from ATLL and TSP/HAM, HTLV-1 infection can lead to several other diseases such as uveitis, conjunctivitis, sicca syndrome, interstitial keratitis, pulmonary diseases, infective dermatitis, arthritis, myositis, Sjögren's syndrome, Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease and polyneuropathies [127]. Often left aside in comparison to TSP/HAM and ATLL, these HTLV-1-associated diseases are quite numerous. An accumulation of HTLV-1 infected T-cells in the eyes, and the subsequent release of various inflammatory cytokines by these cells is considered to cause HTLV-1-associated uveitis for example [128]. The prevalence rate and the risk factors of these syndromes are poorly evaluated. Despite occurring frequently in TSP/HAM patients, these inflammatory syndromes can also appear in HTLV-1 carriers non-diagnosed for TSP/HAM or ATLL. HTLV-1-associated infective dermatitis, which is the main manifestation of HTLV-1 in children and diagnosed by exudative eczematous eruption, is frequently associated with further development of TSP/HAM and in some cases of ATLL [129,130]. However, because it is characterized by an exacerbated Th1 immune response and a higher HTLV-1 proviral load than in asymptomatic HTLV-1 carriers, HTLV-1-associated infective dermatitis is rather believed to be a risk factor of TSP/HAM development [131]. Apart from inflammatory manifestations, HTLV-1 infection can also lead to opportunistic infections in patients with ATLL such as *Strongyloides stercoralis*, crusted scabies, tuberculosis or leprosy [132].

## 6. HIV-1 and HTLV-1 Co-Infections

As mentioned above, HIV-1 and HTLV-1 share common routes of transmission and cellular tropism. In regards to the simultaneous prevalence of these viruses in different parts of the world, HIV-1/HTLV-1 co-infection has frequently been reported. One of the first studies reporting a co-infection has shown that approximately 7% of individuals with AIDS or an AIDS-related disease are also seroprevalent for HTLV-1 [133]. However, the distinction between HTLV-1 and HTLV-2, a closely related virus from HTLV-1, was not possible at that time, thus supporting an overestimation of the real prevalence of HIV-1/HTLV-1 co-infections. During the second half of the 1980s, several HIV-1/HTLV-1 co-infection events were reported in Europe, America, and Africa, especially in hemophiliacs, intravenous drug users, homosexuals and sexual workers [134]. Nowadays, HTLV-1 and HIV-1 co-infection is mainly investigated in South America and Africa [135–142], with prevalence ranging from 0.5 to 10.9% depending on the studies. Differences in regional endemicity, ethnic origin of the

population, risk behaviors and study designs could account for such variability. The consequences of HIV-1 and HTLV-1 co-infection may act at two levels: the cellular level and the host level.

In vitro co-infection of a given CD4+ T-cell by both HTLV-1 and HIV-1 has been reported [143]. In addition, co-infection of HTLV-1-infected cells by HIV-1 is also possible [144], suggesting the potential presence of both viruses in the same CD4+ T-cells in co-infected individuals. Of note, all virally infected cells are resistant to re-infection by a similar type of virus. As an example, resistance to HIV-1 superinfection was described [145]. Resistance to HTLV-1 superinfection has also been suggested following the observation that during natural infection, most HTLV-1-infected T-cells contain only a single integrated provirus [146]. It was previously suggested that HIV-1 replication could be enhanced through HTLV-1 Tax protein expression. Indeed, Tax enhances NF- $\kappa$ B activity [147], which in turn recognizes responsive elements on the HIV-1 promoter [148]. This observation was later supported by another study, in which Tax promoted HIV-1 transcription in latent CD4+ T-cells [149]. In contrast, a daily treatment with recombinant Tax protein added to the culture medium of in vitro HIV-1-infected PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) showed opposite effects, with an inhibition of HIV-1 replication up to 14 days after infection [150]. Furthermore, HTLV-1-infected cells produce a wide range of chemokines, such as MIP-1  $\alpha$  (Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha), MIP-1  $\beta$  or RANTES (Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted) [151], which could act in an autocrine loop to suppress HIV-1 replication [152]. However, the level of chemokines secreted by co-infected cells is difficult to evaluate in vivo, and the effect of HTLV-1 co-infection on HIV-1 replication and vice versa deserves better investigation. In particular, sequential infections, i.e., whether the individuals were first infected by HIV-1 or HTLV-1, the length of mono-infection, and the extend of cellular defects induced by mono-infection before co-infection may lead to different outcomes in terms of HIV-1 or HTLV-1 replication. Taken together, these studies do not allow conclusions on a positive or a negative regulatory effect of HTLV-1 on HIV-1 in co-infected individuals.

The effect of HIV-1/HTLV-1 co-infection on the pathological conditions seems clearer and converges with a worsening of symptoms linked to HIV-1 or HTLV-1 infection [134,153]. Although the number of documented HIV-1/HTLV-1 co-infected cohorts remains low, it is believed that HTLV-1 worsens HIV-1 infection by accelerating progression to AIDS or increasing mortality [154]. Because co-infected patients usually have significantly higher CD4+ T-cell counts than HIV-1 mono-infected patients, their AIDS diagnosis may be impaired, leading to a significant reduction of their survival time [154]. In addition, in comparison to HIV-1 mono-infected individuals, most HIV-1/HTLV-1 co-infected individuals are more likely to suffer from myelopathy, thrombocytopenia, bronchitis, urinary tract infection or opportunistic infection, regardless of the age, ethnicity or CD4+ T-cells count [155,156]. Several reports support that HIV-1/HTLV-1 co-infection can influence the development of HTLV-1-associated diseases, with a worsening impact of HIV-1 on the development of ATLL [157] or of TSP/HAM [158–160]. This could be due to the higher production of IL-2 and IFN- $\gamma$  observed in HIV-1/HTLV-1 co-infected individuals compared to HIV-1 or HTLV-1 mono-infected individuals [161], together with the up-regulated levels of RANTES in HIV-1/HTLV-1 co-infected individuals cells [162]. This cytokine profile may thus favor a faster onset of myelopathies and neurological disorders in co-infected individuals.

## 7. HTLV-1 Treatment and Drug Development

### 7.1. ATLL

Since 1978, several clinical trials performed by the Japan Clinical Oncology Group aimed at improving chemotherapeutic treatments used to treat ATLL patients [163]. The first generation of chemotherapy, consisting of CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone) or CHOP-like treatments, resulted in relatively poor outcomes. Almost 20 years later, clinical trials of LSG15 (Lymphoma Study Group) based regimens have proven more efficient. LSG15-based regimens are eight-drug regimens consisting of at least VCAP (vincristine, cyclophosphamide, doxorubicin

and prednisone), AMP (doxorubicin, ranimustine and prednisone) and VECP (vindesine, etoposide, carboplatin and prednisone) [164]. Compared to biweekly CHOP treatment, the LSG15-based treatment shows better results on the 3-year overall survival (24% vs. 13%) and on complete remission rates (40% vs. 25%) [165]. However, this was not confirmed in a larger longitudinal study that included 1600 Japanese ATLL patients (with lymphoma or acute ATLL) from 2000 to 2009 [81]. In this large cohort, half of the patients were treated bi-weekly or tri-weekly with CHOP, while 31% received an LSG15-based treatment. A relatively poor benefit of LSG15-based over CHOP treatment was observed. Regardless of the treatment, median survival times were 8.3, 10.6, 31.5, and 55 months for acute, lymphoma, chronic, and smoldering ATLL subtypes, respectively, while 4-year overall survival rates were 11%, 16%, 36%, and 52%, respectively [81]. This further highlights the poor efficiency of chemotherapy. In contrast, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation following chemotherapy for patients with acute or lymphoma ATLL slightly improved the median survival time (14 vs. 6.7 months and 13.9 vs. 9.7 months, respectively) or the 4-year overall survival rates (27.8 vs. 6.8% and 32.3 vs. 13.7 months, respectively). Even though allogeneic hematopoietic stem cell transplantation constitutes an efficient treatment [166], ATLL patients resistant to chemotherapy are not able to receive this kind of transplantation. Furthermore, chronic and smoldering ATLL subtypes are considered indolent and are usually managed with watchful waiting. A long clinical follow-up of chronic and smoldering ATLL patients estimated a 15-year overall survival rate of 14.1%, with more than 60% of patients who died from an evolution of their indolent ATLL toward an acute ATLL. Thus, both new therapies development for aggressive forms of ATLL and better follow-up of indolent forms of ATLL are important.

To circumvent poor remission rates associated with chemotherapeutic treatments, efficacy of antiviral therapies has also been investigated. A treatment based on the combination of zidovudine (ZDV) and IFN- $\alpha$  showed high response rates in several clinical studies [167,168], especially when used as a first-line therapy in acute ATLL patients. A worldwide meta-analysis on the use of ZDV and IFN- $\alpha$  was then performed on about 250 ATLL patients [169]. This antiviral treatment increased the 5-year overall survival rate when used as a first-line antiviral therapy compared to chemotherapy (46% vs. 20%, respectively), but it decreased the survival rate when used after chemotherapy (12% vs. 20%, respectively). However, this effect was only observed in acute and chronic/smoldering subtypes, and not in the lymphoma subtype. Moreover, the 5-year overall survival rate reached 82% when complete remission of acute ATLL patients was achieved before antiviral therapy. Thus, a combination of ZDV and IFN- $\alpha$  should be considered as the gold standard first-line therapy in leukemic subtypes of ATLL, and its use is already established in France, the United Kingdom and Florida, but not in Japan, where the Japanese national health insurance system did not approve its use. So far, the optimal duration for ZDV/IFN- $\alpha$  treatment is yet unknown. A recent clinical case reported a sustained complete remission of a patient with chronic ATLL, still 6 years after the end of a 5-year treatment [170]. To increase the clinical cure of ATLL patients, immunotherapies based on monoclonal antibodies targeting specific markers of ATLL cells were tested. As such, targeting CD2 [171] or CD25 [172] showed poor to no effect when used in combination with chemotherapy. In contrast, the CCR4 chemokine receptor seems an interesting target. Indeed, it is overexpressed on HTLV-1 infected cells, and in approximately 90% of ATLL cases [85]. In addition, CCR4 positivity on ATLL cells has been associated with unfavorable prognosis [173]. Thus, a humanized anti-CCR4 monoclonal antibody (Mogamulizumab) has been generated. This defucosylated antibody induces a strong antibody-dependent cellular cytotoxicity, because of its high affinity binding to effector cells. Mogamulizumab monotherapy showed clinically meaningful antitumor activity, with an acceptable toxicity profile, in patients with aggressive ATLL, who relapsed after at least one chemotherapy regimen [174]. These encouraging results fostered the use of mogamulizumab in combination with LSG15-based chemotherapy to treat aggressive ATLL patients [175]. An increased complete remission rate was observed with a combined therapy of LSG15-based regimen with mogamulizumab, compared to LSG15-based alone (52% vs. 33%), but without any change in the overall survival rate [175].

Although LSG15-based treatment plus mogamulizumab was found to be associated with adverse drug reactions, notably infusion reaction and skin rash, most of those are manageable. Surprisingly, it has been recently observed that skin rash development was associated with a better prognosis [176]. Further clinical investigations are now required to evaluate mogamulizumab's activity in a larger cohort of ATLL patients.

In the last 5 years, several isolated studies have focused on additional promising drugs that inhibit ATLL cell proliferation or induce cell death by several mechanisms. Among them are chemotherapeutic molecules such as lenalidomide [177] or bortezomib [178]; plant-derived steroids, alkaloids or carotenoids [179,180]; pro-apoptotic molecules such as Bcl-2 (B-cell Lymphoma 2) inhibitors [181,182], CDK9 (Cyclin-dependent Kinase 9) inhibitor [183] or arsenic in combination with ZDV and IFN- $\alpha$  [184]; histone deacetylase, such as valproate; inhibitors of iron uptake such as antibodies directed against the Transferrin Receptor 1 [185]; p53 expression activator such as synthetic retinoid ST1926 [186]; or an HTLV-1-targeted gene editing zinc-finger nuclease [187].

## 7.2. TSP/HAM

Contrary to ATLL, for which current therapies are mainly targeting HTLV-1-infected cells (Figure 1F), the management of TSP/HAM mainly consists in treating clinical symptoms. The anti-inflammatory corticosteroid prednisolone remains a typical treatment, due to the inflammation-based manifestations of TSP/HAM [120]. Corticosteroids currently represent the most effective anti-inflammatory therapy for most chronic inflammatory diseases, both by inhibiting inflammatory gene expression and activating anti-inflammatory gene expression. For patients with TSP/HAM, treatment effectiveness can be evaluated by assessing the motor disability through the Osame Motor Disability Score [77]. Until now, corticosteroids effectiveness in patients with TSP/HAM has largely been controversial among clinical studies, with none of them using a placebo-controlled trial, nor evaluating the long-term efficiency of the treatment. A recent retrospective study, however, analyzed prednisolone-treated TSP/HAM patients and untreated TSP/HAM patients for several years [188]. Continuous uptake of low-doses of prednisolone by TSP/HAM patients improved their Osame Motor Disability Score both in short-term (less than 3 years) and long-term (more than 3 years) durations of treatment, in comparison to untreated TSP/HAM patients. Because corticosteroid treatments are neither efficient nor tolerated by some patients, alternative treatments using molecules with anti-inflammatory properties, such as cyclosporine A [189], pentoxifylline [190], danazol [191], or antiviral cytokines, such as IFN- $\alpha$  [192,193] or IFN- $\beta$  [194], have been developed among others [195]. Aside from the general motor disability, other TSP/HAM-associated symptoms, such as spasticity, bladder dysfunctions, urinary tract infections, constipation, neuropathic and mechanical pains or erectile troubles are subject to a wide array of drugs [123].

Because the majority of TSP/HAM treatments are designed to suppress clinical symptoms rather than eliminate HTLV-1-infected cells, research is now focusing on drugs that could modulate anti-HTLV-1 immune response and induce a decrease in HTLV-1 proviral load. However, as infected cells mainly spread through mitotic divisions, infected cells may not expose viral antigens for immune recognition. One option thus consists in using additional drugs that first induce viral gene expression. For instance, valproate, a histone deacetylase inhibitor, induces HTLV-1 proviral gene expression and can therefore expose virus-infected cells to immune response, notably to HTLV-1-specific cytotoxic lysis. Valproate long-term treatment is safe, but does not improve motor disability [196]. Analysis of valproate efficiency also led to conflicting results regarding its efficiency on proviral load decrease. One study reported an efficient 24-fold decrease in the proviral load after 3 months of treatment [197], while another one reported no proviral load decrease after 2 years of treatment, nor any difference in the CD8+ lysis efficiency [196]. Interestingly however, in asymptomatic baboons naturally infected with STLV-1, treatment with valproate in combination with ZDV induced a very efficient decrease in proviral load, probably as a consequence of the STLV-1-specific cytotoxic lysis associated with viral expression, together with a prevention of neo-infection by the antiviral effect of ZDV [59]. Therefore,

Although LSG15-based treatment plus mogamulizumab was found to be associated with adverse drug reactions, notably infusion reaction and skin rash, most of those are manageable. Surprisingly, it has been recently observed that skin rash development was associated with a better prognosis [176]. Further clinical investigations are now required to evaluate mogamulizumab's activity in a larger cohort of ATLL patients.

In the last 5 years, several isolated studies have focused on additional promising drugs that inhibit ATLL cell proliferation or induce cell death by several mechanisms. Among them are chemotherapeutic molecules such as lenalidomide [177] or bortezomib [178]; plant-derived steroids, alkaloids or carotenoids [179,180]; pro-apoptotic molecules such as Bcl-2 (B-cell Lymphoma 2) inhibitors [181,182], CDK9 (Cyclin-dependent Kinase 9) inhibitor [183] or arsenic in combination with ZDV and IFN- $\alpha$  [184]; histone deacetylase, such as valproate; inhibitors of iron uptake such as antibodies directed against the Transferrin Receptor 1 [185]; p53 expression activator such as synthetic retinoid ST1926 [186]; or an HTLV-1-targeted gene editing zinc-finger nuclease [187].

## 7.2. TSP/HAM

Contrary to ATLL, for which current therapies are mainly targeting HTLV-1-infected cells (Figure 1F), the management of TSP/HAM mainly consists in treating clinical symptoms. The anti-inflammatory corticosteroid prednisolone remains a typical treatment, due to the inflammation-based manifestations of TSP/HAM [120]. Corticosteroids currently represent the most effective anti-inflammatory therapy for most chronic inflammatory diseases, both by inhibiting inflammatory gene expression and activating anti-inflammatory gene expression. For patients with TSP/HAM, treatment effectiveness can be evaluated by assessing the motor disability through the Osame Motor Disability Score [77]. Until now, corticosteroids effectiveness in patients with TSP/HAM has largely been controversial among clinical studies, with none of them using a placebo-controlled trial, nor evaluating the long-term efficiency of the treatment. A recent retrospective study, however, analyzed prednisolone-treated TSP/HAM patients and untreated TSP/HAM patients for several years [188]. Continuous uptake of low-doses of prednisolone by TSP/HAM patients improved their Osame Motor Disability Score both in short-term (less than 3 years) and long-term (more than 3 years) durations of treatment, in comparison to untreated TSP/HAM patients. Because corticosteroid treatments are neither efficient nor tolerated by some patients, alternative treatments using molecules with anti-inflammatory properties, such as cyclosporine A [189], pentoxifylline [190], danazol [191], or antiviral cytokines, such as IFN- $\alpha$  [192,193] or IFN- $\beta$  [194], have been developed among others [195]. Aside from the general motor disability, other TSP/HAM-associated symptoms, such as spasticity, bladder dysfunctions, urinary tract infections, constipation, neuropathic and mechanical pains or erectile troubles are subject to a wide array of drugs [123].

Because the majority of TSP/HAM treatments are designed to suppress clinical symptoms rather than eliminate HTLV-1-infected cells, research is now focusing on drugs that could modulate anti-HTLV-1 immune response and induce a decrease in HTLV-1 proviral load. However, as infected cells mainly spread through mitotic divisions, infected cells may not expose viral antigens for immune recognition. One option thus consists in using additional drugs that first induce viral gene expression. For instance, valproate, a histone deacetylase inhibitor, induces HTLV-1 proviral gene expression and can therefore expose virus-infected cells to immune response, notably to HTLV-1-specific cytotoxic lysis. Valproate long-term treatment is safe, but does not improve motor disability [196]. Analysis of valproate efficiency also led to conflicting results regarding its efficiency on proviral load decrease. One study reported an efficient 24-fold decrease in the proviral load after 3 months of treatment [197], while another one reported no proviral load decrease after 2 years of treatment, nor any difference in the CD8+ lysis efficiency [196]. Interestingly however, in asymptomatic baboons naturally infected with STLV-1, treatment with valproate in combination with ZDV induced a very efficient decrease in proviral load, probably as a consequence of the STLV-1-specific cytotoxic lysis associated with viral expression, together with a prevention of neo-infection by the antiviral effect of ZDV [59]. Therefore,



using valproate in combination with antiviral drugs should be considered as a preventive treatment of asymptomatic carriers, to limit the proviral load rise that precedes disease development. Interestingly, multiple combinations of valproate with prednisolone and IFN-I improve the clinical outcome of TSP/HAM patients, and more importantly, efficiently reduce HTLV-1 proviral load [198]. Finally, building upon the success of the CCR4-targeting therapy in ATLL, anti-CCR4 antibodies have also been tested in TSP/HAM patients. Interestingly, mogamulizumab effectively reduces HTLV-1 proviral load, spontaneous proliferation of CCR4-positive CD4+ and CD8+ T-cells, as well as pro-inflammatory cytokines production [199]. Thus, combined therapies using valproate deserve better evaluation since they could offer better therapeutic options. Finally, because the treatments aiming at reducing proviral load and clinical outcomes are not fully efficient, and because multiple ranges of symptoms are associated with TSP/HAM, a physiotherapeutic approach seems useful to reduce pain, flaccidity, sedentariness, bowel and bladder troubles, and to improve patients' overall quality of life [200].

### 7.3. Other Symptoms

Uveitis treatment is based on topical and systemic corticosteroids, in addition to lubricating drops which are used to prevent subsequent ocular complications [127]. Dermatological conditions associated with HTLV-1 are quite numerous and treatment depends on the diagnosis. Patients with ATLL often develop opportunistic infections, due to their immunocompromised state, and the associated treatment (antibacterial, fungicide, anti-helminthic) depends on the nature of the pathogen [201]. A decreased efficiency of *Strongyloides stercoralis* treatment has been reported in HTLV-1-infected patients compared to HTLV-1 seronegative individuals [202]. This was mainly associated to a decreased IgE (Immunoglobulin E) secretion in HTLV-1-infected patients. In addition, other cytokines such as IL-4, IL-5 and IL-13, which potentiate anti-helminthic responses, also decrease during the course of HTLV-1 infection, especially through IFN- $\gamma$  production [203], thus making HTLV-1 infection an important risk factor for *Strongyloides stercoralis* dissemination. Unfortunately, *Strongyloides stercoralis* infection stimulates HTLV-1 clonal expansion in asymptomatic individuals [204]. Similar to *Strongyloides stercoralis* infection, HTLV-1-infected individuals with infective dermatitis have an increased abundance of HTLV-1 positive clones [205]. Thus, it seems appropriate to develop specific treatments for HTLV-1-infected individuals against *Strongyloides stercoralis* and infective dermatitis [203].

### 7.4. HIV-1/HTLV-1 Co-Infection

As discussed above, HIV-1/HTLV-1 co-infection can worsen the clinical outcome of HTLV-1 infection. Indeed, the lifetime risk of TSP/HAM is higher in HIV-1/HTLV-1 co-infected patients than in HTLV-1 mono-infected patients. Moreover, this lifetime risk is even higher in co-infected patients under ART, which seems responsible for neurological complications [142,158,206]. It has been shown that ART composed of zidovudine, lamivudine and abacavir (or didanosine), initially prescribed to treat HIV-1 infection in HIV-1/HTLV-1 co-infected patients, triggers an increase in HTLV-1 proviral load [207]. While HTLV-1 stimulates lymphocyte proliferation without cytopathic effects, HIV-1 induces a severe lymphocytic depletion with intensive cytopathic activity [208]. Because CD4+ T-cells are targeted by both HIV-1 and HTLV-1, HIV-1/HTLV-1 co-infection may complicate HIV-1 management, especially by "artificially" elevating the CD4+ T-cells count in co-infected individuals compared to HIV-1 mono-infected individuals. A decrease in the CD4+ T-cell count has long been considered as an evidence of progression to AIDS, and also an indicator determining when to initiate ART in resource-limited areas. Thus, co-infection by HTLV-1 may mask HIV-1 induced immunosuppression, and therefore could complicate the timing of ART initiation, worsening AIDS progression and favoring subsequent opportunistic infections. In conclusion, HTLV-1 serological status should be checked in all HIV-1 patients from HTLV-1 endemic areas, in order to start ART without taking into account the CD4+ T-cells count. However, as ART seems to worsen HTLV-1 infection, combined therapies targeting HTLV-1 in addition to HIV-1 infection should be considered.

## 8. Vaccine

There is no vaccine to prevent or cure HIV-1 or HTLV-1 infections. The idea of developing an HTLV-1 vaccine already emerged in the 1980s, and it seemed at first easier than developing an HIV-1 vaccine [6]. The feasibility of an HTLV-1 vaccine has been supported first by the worldwide genetic stability among HTLV-1 strains, secondly by successful vaccination in animal models, and finally by the presence of potent HTLV-1-associated immune responses in infected individuals [6]. When expressed by a vaccinia vector, the HTLV-1 envelope gene induces a partial protection against HTLV-1 infection in rodents [209], probably through the generation of neutralizing antibodies directed toward the viral envelope, thus responsible of an efficient active immunotherapy [210]. In line with this observation, newborns from HTLV-1-infected mothers are protected from HTLV-1 infection as long as breastfeeding allows the transfer of antibodies from the mother, indicating that neutralizing antibodies are likely to prevent HTLV-1 infection [211]. Despite this interesting asset, both HTLV-1 cell-to-cell transmission and clonal expansion of infected cells without expression of viral proteins may contribute to limit HTLV-1 envelope exposure *in vivo*.

A therapeutic vaccine based on autologous dendritic cells pulsed with CD8+ -specific Tax antigens induced sustained immune responses and showed promising effects on three ATLL patients either by stabilizing disease progression or inducing a partial remission [212]. However, targeting Tax to induce immune responses may not be the most appropriate method, since Tax expression is barely detectable in ATLL cells. In contrast, HBZ is constitutively expressed *in vivo* and acts as a protective CTL target antigen [213]. Thus, an HBZ-vaccine, based on a vaccinia platform, was tested in mouse models and was shown to elicit specific T-cell responses and eradication of HBZ-induced lymphoma [214]. Currently, an anti-HTLV-1 lentiviral vector-based vaccine, encoding a unique polypeptide derived from Tax, HBZ, p12 and p30 viral proteins, has proven to be safe and efficient to induce a cellular response in mice. In addition, monocytes from ATLL patients, which were further differentiated in dendritic cells and infected by the lentiviral vector *in vitro*, were able to stimulate autologous CD8+ T-cells, with consequent expression of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha), IL-2 and perforin *in vitro*. These encouraging results now need to be confirmed in clinical trials.

## 9. Conclusions

More than three decades of HIV-1 and HTLV-1 studies have greatly improved knowledge regarding their viral cycle as well as the patients' management. Yet, complete remission of both viruses is not fully achieved, especially with the absence of a preventive or prophylactic vaccine. Furthermore, the lack of an efficient treatment for HTLV-1-associated diseases greatly impedes HTLV-1 cure. Development of new drugs is thus strongly needed. This could, in particular, help to treat HIV-1/HTLV-1 co-infected patients for whom therapeutic options focused on HIV-1 currently worsen HTLV-1-associated clinical outcome. In addition, large-scale clinical studies of HIV-1/HTLV-1 co-infected patients are still necessary to better understand the mutual viral interplay and its influence on diseases development. Recently, an HTLV-1 taskforce was launched by the Global Virus Network, in order to expand epidemiological studies, to increase research on HTLV-1 persistence mechanisms, replication and pathogenesis, to discover effective treatments, but also to develop a vaccine against HTLV-1 [215]. This initiative will certainly boost HTLV-1 research, as this virus has frequently been outshined by HIV-1 in the scientific scene.

**Acknowledgments:** The authors acknowledge Chloé Journo and Morgane Avellaneda for their critical reading. Nicolas Futsch is supported by a Ph.D. grant from La ligue contre le Cancer, Hélène Dutartre is supported by INSERM and Renaud Mahieux is supported by Ecole Normale Supérieure de Lyon. The authors acknowledge the financial support from La Ligue Contre le Cancer (équipe Labellis ee).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Poiesz, B.J.; Ruscetti, F.W.; Gazdar, A.F.; Bunn, P.A.; Minna, J.D.; Gallo, R.C. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 7415–7419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Yoshida, M.; Miyoshi, I.; Hinuma, Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 2031–2035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J.C.; Rey, F.; Nugeyre, M.T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axler-Blin, C.; Vezinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **1983**, *220*, 868–871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Keele, B.F.; Van Heuverswyn, F.; Li, Y.; Bailes, E.; Takehisa, J.; Santiago, M.L.; Bibollet-Ruche, F.; Chen, Y.; Wain, L.V.; Liegeois, F.; et al. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* **2006**, *313*, 523–526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Vandamme, A.M.; Salemi, M.; Desmyter, J. The simian origins of the pathogenic human T-cell lymphotropic virus type I. *Trends Microbiol.* **1998**, *6*, 477–483. [[CrossRef](#)]
6. De The, G.; Bomford, R. An HTLV-I vaccine: Why, how, for whom? *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **1993**, *9*, 381–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Gessain, A.; Cassar, O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Deeks, S.G.; Overbaugh, J.; Phillips, A.; Buchbinder, S. HIV infection. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2015**, *1*, 15035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Becerra, J.C.; Bildstein, L.S.; Gach, J.S. Recent insights into the HIV/AIDS pandemic. *Microb. Cell* **2016**, *3*, 451–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Hino, S. Establishment of the milk-borne transmission as a key factor for the peculiar endemicity of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): The ATL prevention program nagasaki. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **2011**, *87*, 152–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Kaplan, J.E.; Khabbaz, R.F.; Murphy, E.L.; Hermansen, S.; Roberts, C.; Lal, R.; Heneine, W.; Wright, D.; Matijas, L.; Thomson, R.; et al. Male-to-female transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II: Association with viral load. The retrovirus epidemiology donor study group. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **1996**, *12*, 193–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Okochi, K.; Sato, H. Transmission of ATL (HTLV-I) through blood transfusion. *Princess Takamatsu Symp.* **1984**, *15*, 129–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Murphy, E.L. Infection with human T-lymphotropic virus types-1 and -2 (HTLV-1 and -2): Implications for blood transfusion safety. *Transfus. Clin. Biol.* **2016**, *23*, 13–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Demontis, M.A.; Sadiq, M.T.; Golz, S.; Taylor, G.P. HTLV-1 viral RNA is detected rarely in plasma of HTLV-1 infected subjects. *J. Med. Virol.* **2015**, *87*, 2130–2134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Pique, C.; Jones, K.S. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Sobata, R.; Matsumoto, C.; Uchida, S.; Suzuki, Y.; Satake, M.; Tadokoro, K. Estimation of the infectious viral load required for transfusion-transmitted human T-lymphotropic virus type 1 infection (TT-HTLV-1) and of the effectiveness of leukocyte reduction in preventing TT-HTLV-1. *Vox Sang.* **2015**, *109*, 122–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Satake, M.; Iwanaga, M.; Sagara, Y.; Watanabe, T.; Okuma, K.; Hamaguchi, I. Incidence of human T-lymphotropic virus 1 infection in adolescent and adult blood donors in japan: A nationwide retrospective cohort analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, 1246–1254. [[CrossRef](#)]
18. Richardson, J.H.; Edwards, A.J.; Cruickshank, J.K.; Rudge, P.; Dalglish, A.G. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *J. Virol.* **1990**, *64*, 5682–5687. [[PubMed](#)]
19. Koyanagi, Y.; Itoyama, Y.; Nakamura, N.; Takamatsu, K.; Kira, J.; Iwamasa, T.; Goto, I.; Yamamoto, N. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology* **1993**, *196*, 25–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Macatonia, S.E.; Cruickshank, J.K.; Rudge, P.; Knight, S.C. Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **1992**, *8*, 1699–1706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

21. Nagai, M.; Brennan, M.B.; Sakai, J.A.; Mora, C.A.; Jacobson, S. CD8(+) T cells are an in vivo reservoir for human T-cell lymphotropic virus type I. *Blood* **2001**, *98*, 1858–1861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Campbell, J.H.; Hearps, A.C.; Martin, G.E.; Williams, K.C.; Crowe, S.M. The importance of monocytes and macrophages in HIV pathogenesis, treatment, and cure. *AIDS* **2014**, *28*, 2175–2187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kandathil, A.J.; Sugawara, S.; Balagopal, A. Are T cells the only HIV-1 reservoir? *Retrovirology* **2016**, *13*, 86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. McLroy, D.; Autran, B.; Cheynier, R.; Wain-Hobson, S.; Clauvel, J.P.; Oksenhendler, E.; Debre, P.; Hosmalin, A. Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *J. Virol.* **1995**, *69*, 4737–4745. [[PubMed](#)]
25. Pope, M.; Gezelter, S.; Gallo, N.; Hoffman, L.; Steinman, R.M. Low levels of HIV-1 infection in cutaneous dendritic cells promote extensive viral replication upon binding to memory CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* **1995**, *182*, 2045–2056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Dutartre, H.; Claviere, M.; Journo, C.; Mahieux, R. Cell-free versus cell-to-cell infection by human immunodeficiency virus type 1 and human T-lymphotropic virus type 1: Exploring the link among viral source, viral trafficking, and viral replication. *J. Virol.* **2016**, *90*, 7607–7617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Zhang, W.; Cao, S.; Martin, J.L.; Mueller, J.D.; Mansky, L.M. Morphology and ultrastructure of retrovirus particles. *AIMS Biophys.* **2015**, *2*, 343–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Fogarty, K.H.; Berk, S.; Grigsby, I.F.; Chen, Y.; Mansky, L.M.; Mueller, J.D. Interrelationship between cytoplasmic retroviral Gag concentration and Gag-membrane association. *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 1611–1624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Alais, S.; Mahieux, R.; Dutartre, H. Viral source-independent high susceptibility of dendritic cells to human T-cell leukemia virus type 1 infection compared to that of T lymphocytes. *J. Virol.* **2015**, *89*, 10580–10590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Jones, K.S.; Petrow-Sadowski, C.; Huang, Y.K.; Bertolette, D.C.; Ruscetti, F.W. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 429–436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Li, K.; Zhang, S.; Kronqvist, M.; Wallin, M.; Ekstrom, M.; Derse, D.; Garoff, H. Intersubunit disulfide isomerization controls membrane fusion of human T-cell leukemia virus env. *J. Virol.* **2008**, *82*, 7135–7143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Shinagawa, M.; Jinno-Oue, A.; Shimizu, N.; Roy, B.B.; Shimizu, A.; Hoque, S.A.; Hoshino, H. Human T-cell leukemia viruses are highly unstable over a wide range of temperatures. *J. Gen. Virol.* **2012**, *93*, 608–617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Derse, D.; Hill, S.A.; Lloyd, P.A.; Chung, H.; Morse, B.A. Examining human T-lymphotropic virus type 1 infection and replication by cell-free infection with recombinant virus vectors. *J. Virol.* **2001**, *75*, 8461–8468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gross, C.; Thoma-Kress, A.K. Molecular mechanisms of HTLV-1 cell-to-cell transmission. *Viruses* **2016**, *8*, 74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Iwami, S.; Takeuchi, J.S.; Nakaoka, S.; Mammano, F.; Clavel, F.; Inaba, H.; Kobayashi, T.; Misawa, N.; Aihara, K.; Koyanagi, Y.; et al. Cell-to-cell infection by HIV contributes over half of virus infection. *Elife* **2015**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Igakura, T.; Stinchcombe, J.C.; Goon, P.K.; Taylor, G.P.; Weber, J.N.; Griffiths, G.M.; Tanaka, Y.; Osame, M.; Bangham, C.R. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* **2003**, *299*, 1713–1716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Pais-Correia, A.M.; Sachse, M.; Guadagnini, S.; Robbiati, V.; Lasserre, R.; Gessain, A.; Gout, O.; Alcover, A.; Thoulouze, M.I. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat. Med.* **2010**, *16*, 83–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Van Prooyen, N.; Gold, H.; Andresen, V.; Schwartz, O.; Jones, K.; Ruscetti, F.; Lockett, S.; Gudla, P.; Venzon, D.; Franchini, G. Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 20738–20743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Nejmeddine, M.; Barnard, A.L.; Tanaka, Y.; Taylor, G.P.; Bangham, C.R. Human T-lymphotropic virus, type 1, tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 29653–29660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

40. Chevalier, S.A.; Durand, S.; Dasgupta, A.; Radonovich, M.; Cimarelli, A.; Brady, J.N.; Mahieux, R.; Pise-Masison, C.A. The transcription profile of Tax-3 is more similar to Tax-1 than Tax-2: Insights into HTLV-3 potential leukemogenic properties. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e41003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Mori, N.; Murakami, S.; Oda, S.; Eto, S. Human T-cell leukemia virus type I Tax induces intracellular adhesion molecule-1 expression in T cells. *Blood* **1994**, *84*, 350–351. [[PubMed](#)]
42. Nejmeddine, M.; Bangham, C.R. The HTLV-1 virological synapse. *Viruses* **2010**, *2*, 1427–1447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Hubner, W.; McNerney, G.P.; Chen, P.; Dale, B.M.; Gordon, R.E.; Chuang, F.Y.; Li, X.D.; Asmuth, D.M.; Huser, T.; Chen, B.K. Quantitative 3D video microscopy of hiv transfer across T cell virological synapses. *Science* **2009**, *323*, 1743–1747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Sattentau, Q.J. Cell-to-cell spread of retroviruses. *Viruses* **2010**, *2*, 1306–1321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Rudnicka, D.; Feldmann, J.; Porrot, F.; Wietgreffe, S.; Guadagnini, S.; Prevost, M.C.; Estaquier, J.; Haase, A.T.; Sol-Foulon, N.; Schwartz, O. Simultaneous cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus to multiple targets through polysynapses. *J. Virol.* **2009**, *83*, 6234–6246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ivanchenko, S.; Godinez, W.J.; Lampe, M.; Krausslich, H.G.; Eils, R.; Rohr, K.; Brauchle, C.; Muller, B.; Lamb, D.C. Dynamics of HIV-1 assembly and release. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000652. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Jolly, C.; Welsch, S.; Michor, S.; Sattentau, Q.J. The regulated secretory pathway in CD4(+) T cells contributes to human immunodeficiency virus type-1 cell-to-cell spread at the virological synapse. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Rustom, A.; Saffrich, R.; Markovic, I.; Walther, P.; Gerdes, H.H. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* **2004**, *303*, 1007–1010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Sherer, N.M.; Lehmann, M.J.; Jimenez-Soto, L.F.; Horensavitz, C.; Pypaert, M.; Mothes, W. Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 310–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Malbec, M.; Roesch, F.; Schwartz, O. A new role for the HTLV-1 p8 protein: Increasing intercellular conduits and viral cell-to-cell transmission. *Viruses* **2011**, *3*, 254–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Wattel, E.; Cavrois, M.; Gessain, A.; Wain-Hobson, S. Clonal expansion of infected cells: A way of life for HTLV-I. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **1996**, *13*, S92–S99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Matsuoka, M.; Jeang, K.T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 270–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Hanon, E.; Hall, S.; Taylor, G.P.; Saito, M.; Davis, R.; Tanaka, Y.; Usuku, K.; Osame, M.; Weber, J.N.; Bangham, C.R. Abundant Tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. *Blood* **2000**, *95*, 1386–1392. [[PubMed](#)]
54. Kinpara, S.; Hasegawa, A.; Utsunomiya, A.; Nishitsuji, H.; Furukawa, H.; Masuda, T.; Kannagi, M. Stromal cell-mediated suppression of human T-cell leukemia virus type 1 expression in vitro and in vivo by type I interferon. *J. Virol.* **2009**, *83*, 5101–5108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Cachat, A.; Chevalier, S.A.; Alais, S.; Ko, N.L.; Ratner, L.; Journo, C.; Dutartre, H.; Mahieux, R.  $\alpha$  interferon restricts human T-lymphotropic virus type 1 and 2 de novo infection through PKR activation. *J. Virol.* **2013**, *87*, 13386–13396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Ilinskaya, A.; Derse, D.; Hill, S.; Princler, G.; Heidecker, G. Cell-cell transmission allows human T-lymphotropic virus 1 to circumvent tetherin restriction. *Virology* **2013**, *436*, 201–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Taylor, G.P.; Goon, P.; Furukawa, Y.; Green, H.; Barfield, A.; Mosley, A.; Nose, H.; Babiker, A.; Rudge, P.; Usuku, K.; et al. Zidovudine plus lamivudine in human T-lymphotropic virus type-I-associated myelopathy: A randomised trial. *Retrovirology* **2006**, *3*, 63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Fox, J.M.; Hilburn, S.; Demontis, M.A.; Brighty, D.W.; Rios Grassi, M.F.; Galvao-Castro, B.; Taylor, G.P.; Martin, F. Long terminal repeat circular DNA as markers of active viral replication of human T lymphotropic virus-1 in vivo. *Viruses* **2016**, *8*, 80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Afonso, P.V.; Mekaouche, M.; Mortreux, F.; Toulza, F.; Moriceau, A.; Wattel, E.; Gessain, A.; Bangham, C.R.; Dubreuil, G.; Plumelle, Y.; et al. Highly active antiretroviral treatment against STLV-1 infection combining reverse transcriptase and HDAC inhibitors. *Blood* **2010**, *116*, 3802–3808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Macchi, B.; Balestrieri, E.; Ascolani, A.; Hilburn, S.; Martin, F.; Mastino, A.; Taylor, G.P. Susceptibility of primary HTLV-1 isolates from patients with HTLV-1-associated myelopathy to reverse transcriptase inhibitors. *Viruses* **2011**, *3*, 469–483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

61. Macchi, B.; Faraoni, I.; Zhang, J.; Grelli, S.; Favalli, C.; Mastino, A.; Bonmassar, E. Azt inhibits the transmission of human T cell leukaemia/lymphoma virus type I to adult peripheral blood mononuclear cells in vitro. *J. Gen. Virol.* **1997**, *78*, 1007–1016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Agosto, L.M.; Uchil, P.D.; Mothes, W. HIV cell-to-cell transmission: Effects on pathogenesis and antiretroviral therapy. *Trends Microbiol.* **2015**, *23*, 289–295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Turpin, J.; Alais, S.; Marçais, A.; Bruneau, J.; Melamed, A.; Gadot, N.; Tanaka, Y.; Hermine, O.; Melot, S.; Lacoste, R.; et al. Whole body clonality analysis in an aggressive HTLV-1 associated leukemia (ATLL) reveals an unexpected clonal complexity. *Cancer Lett.* **2017**, *389*, 78–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Villaudy, J.; Wencker, M.; Gadot, N.; Gillet, N.A.; Scoazec, J.Y.; Gazzolo, L.; Manz, M.G.; Bangham, C.R.; Dodon, M.D. HTLV-1 propels thymic human T cell development in “human immune system” Rag2(−)/(−)  $\gamma$  c(−)/(−) mice. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Furuta, R.; Yasunaga, J.I.; Miura, M.; Sugata, K.; Saito, A.; Akari, H.; Ueno, T.; Takenouchi, N.; Fujisawa, J.I.; Koh, K.R.; et al. Human T-cell leukemia virus type 1 infects multiple lineage hematopoietic cells in vivo. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Lorenzo-Redondo, R.; Fryer, H.R.; Bedford, T.; Kim, E.Y.; Archer, J.; Pond, S.L.K.; Chung, Y.S.; Penugonda, S.; Chipman, J.; Fletcher, C.V.; et al. Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature* **2016**, *530*, 51–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Gillet, N.A.; Malani, N.; Melamed, A.; Gormley, N.; Carter, R.; Bentley, D.; Berry, C.; Bushman, F.D.; Taylor, G.P.; Bangham, C.R. The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T-cell clones. *Blood* **2011**, *117*, 3113–3122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Cook, L.B.; Melamed, A.; Demontis, M.A.; Laydon, D.J.; Fox, J.M.; Tosswill, J.H.; de Freitas, D.; Price, A.D.; Medcalf, J.F.; Martin, F.; et al. Rapid dissemination of human T-lymphotropic virus type 1 during primary infection in transplant recipients. *Retrovirology* **2016**, *13*, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Jain, P.; Manuel, S.L.; Khan, Z.K.; Ahuja, J.; Quann, K.; Wigdahl, B. DC-sign mediates cell-free infection and transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 by dendritic cells. *J. Virol.* **2009**, *83*, 10908–10921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Rizkallah, G.; Alais, S.; Futsch, N.; Tanaka, Y.; Journo, C.; Mahieux, R.; Dutartre, H. Dendritic cell maturation, but not type I interferon exposure, restricts infection by HTLV-1, and viral transmission to T-cells. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006353. [[CrossRef](#)]
71. Ali, A.; Patterson, S.; Cruickshank, K.; Rudge, P.; Dalgleish, A.G.; Knight, S.C. Dendritic cells infected in vitro with human T cell leukaemia/lymphoma virus type-1 (HTLV-1); enhanced lymphocytic proliferation and tropical spastic paraparesis. *Clin. Exp. Immunol.* **1993**, *94*, 32–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Makino, M.; Shimokubo, S.; Wakamatsu, S.I.; Izumo, S.; Baba, M. The role of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-infected dendritic cells in the development of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J. Virol.* **1999**, *73*, 4575–4581. [[PubMed](#)]
73. Rahman, S.; Manuel, S.L.; Khan, Z.K.; Wigdahl, B.; Acheampong, E.; Tangy, F.; Jain, P. Depletion of dendritic cells enhances susceptibility to cell-free infection of human t cell leukemia virus type 1 in CD11C-diphtheria toxin receptor transgenic mice. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 5553–5561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Valeri, V.W.; Hryniewicz, A.; Andresen, V.; Jones, K.; Fenizia, C.; Bialuk, I.; Chung, H.K.; Fukumoto, R.; Parks, R.W.; Ferrari, M.G.; et al. Requirement of the human T-cell leukemia virus p12 and p30 products for infectivity of human dendritic cells and macaques but not rabbits. *Blood* **2010**, *116*, 3809–3817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Bangham, C.R.; Cook, L.B.; Melamed, A. HTLV-1 clonality in adult T-cell leukaemia and non-malignant HTLV-1 infection. *Semin. Cancer Biol.* **2014**, *26*, 89–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Alvarez, C.; Gotuzzo, E.; Vandamme, A.M.; Verdonck, K. Family aggregation of human T-lymphotropic virus 1-associated diseases: A systematic review. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Osame, M.; Janssen, R.; Kubota, H.; Nishitani, H.; Igata, A.; Nagataki, S.; Mori, M.; Goto, I.; Shimabukuro, H.; Khabbaz, R.; et al. Nationwide survey of HTLV-1-associated myelopathy in japan: Association with blood transfusion. *Ann. Neurol.* **1990**, *28*, 50–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Tsukasaki, K.; Tobinai, K. Clinical trials and treatment of ATL. *Leuk. Res. Treat.* **2012**, *2012*, 101754. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Uchiyama, T.; Yodoi, J.; Sagawa, K.; Takatsuki, K.; Uchino, H. Adult T-cell leukemia: Clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* **1977**, *50*, 481–492. [[CrossRef](#)]

80. Shimoyama, M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the lymphoma study group (1984–1987). *Br. J. Haematol.* **1991**, *79*, 428–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Katsuya, H.; Ishitsuka, K.; Utsunomiya, A.; Hanada, S.; Eto, T.; Moriuchi, Y.; Saburi, Y.; Miyahara, M.; Sueoka, E.; Uike, N.; et al. Treatment and survival among 1594 patients with ATL. *Blood* **2015**, *126*, 2570–2577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Mehta-Shah, N.; Ratner, L.; Horwitz, S.M. Adult T-cell leukemia/lymphoma. *J. Oncol. Pract.* **2017**, *13*, 487–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Dahmouh, L.; Hijazi, Y.; Barnes, E.; Stetler-Stevenson, M.; Abati, A. Adult t-cell leukemia/lymphoma: A cytopathologic, immunocytochemical, and flow cytometric study. *Cancer* **2002**, *96*, 110–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Kagdi, H.H.; Demontis, M.A.; Fields, P.A.; Ramos, J.C.; Bangham, C.R.; Taylor, G.P. Risk stratification of adult T-cell leukemia/lymphoma using immunophenotyping. *Cancer Med.* **2017**, *6*, 298–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Yoshie, O.; Fujisawa, R.; Nakayama, T.; Harasawa, H.; Tago, H.; Izawa, D.; Hieshima, K.; Tatsumi, Y.; Matsushima, K.; Hasegawa, H.; et al. Frequent expression of CCR4 in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1-transformed T cells. *Blood* **2002**, *99*, 1505–1511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Nakahata, S.; Morishita, K. CADM1/TSLC1 is a novel cell surface marker for adult T-cell leukemia/lymphoma. *J. Clin. Exp. Hematop.* **2012**, *52*, 17–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Kobayashi, S.; Nakano, K.; Watanabe, E.; Ishigaki, T.; Ohno, N.; Yuji, K.; Oyaizu, N.; Asanuma, S.; Yamagishi, M.; Yamochi, T.; et al. CADM1 expression and stepwise downregulation of CD7 are closely associated with clonal expansion of HTLV-I-infected cells in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 2851–2861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Afonso, P.V.; Zamborlini, A.; Saib, A.; Mahieux, R. Centrosome and retroviruses: The dangerous liaisons. *Retrovirology* **2007**, *4*, 27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Cook, L.; Melamed, A.; Yaguchi, H.; Bangham, C.R. The impact of HTLV-1 on the cellular genome. *Curr. Opin. Virol.* **2017**, *26*, 125–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Kogure, Y.; Kataoka, K. Genetic alterations in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Sci.* **2017**, *108*, 1719–1725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Watanabe, T. Adult T-cell leukemia: Molecular basis for clonal expansion and transformation of HTLV-1-infected T cells. *Blood* **2017**, *129*, 1071–1081. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Currier, R.; Van Duyn, R.; Jaworski, E.; Guendel, I.; Sampey, G.; Das, R.; Narayanan, A.; Kashanchi, F. HTLV Tax: A fascinating multifunctional co-regulator of viral and cellular pathways. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Journo, C.; Douceron, E.; Mahieux, R. HTLV gene regulation: Because size matters, transcription is not enough. *Future Microbiol.* **2009**, *4*, 425–440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Matsumoto, K.; Shibata, H.; Fujisawa, J.I.; Inoue, H.; Hakura, A.; Tsukahara, T.; Fujii, M. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein transforms rat fibroblasts via two distinct pathways. *J. Virol.* **1997**, *71*, 4445–4451. [[PubMed](#)]
95. Tanaka, A.; Takahashi, C.; Yamaoka, S.; Nosaka, T.; Maki, M.; Hatanaka, M. Oncogenic transformation by the tax gene of human T-cell leukemia virus type I in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 1071–1075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Shirinian, M.; Kambris, Z.; Hamadeh, L.; Grabbe, C.; Journo, C.; Mahieux, R.; Bazarbachi, A. A transgenic drosophila melanogaster model to study human T-lymphotropic virus oncoprotein Tax-1-driven transformation in vivo. *J. Virol.* **2015**, *89*, 8092–8095. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Niewiesk, S. Animals models of human t cell leukemia virus type I leukemogenesis. *ILAR J.* **2016**, *57*, 3–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Bellon, M.; Baydoun, H.H.; Yao, Y.; Nicot, C. HTLV-I Tax-dependent and -independent events associated with immortalization of human primary T lymphocytes. *Blood* **2010**, *115*, 2441–2448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Aboud, M.; Golde, D.W.; Bersch, N.; Rosenblatt, J.D.; Chen, I.S. A colony assay for in vitro transformation by human T cell leukemia viruses type I and type II. *Blood* **1987**, *70*, 432–436. [[PubMed](#)]
100. Satou, Y.; Yasunaga, J.; Zhao, T.; Yoshida, M.; Miyazato, P.; Takai, K.; Shimizu, K.; Ohshima, K.; Green, P.L.; Ohkura, N.; et al. HTLV-1 bzip factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1001274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

101. Takeda, S.; Maeda, M.; Morikawa, S.; Taniguchi, Y.; Yasunaga, J.; Nosaka, K.; Tanaka, Y.; Matsuoka, M. Genetic and epigenetic inactivation of Tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int. J. Cancer* **2004**, *109*, 559–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Koiwa, T.; Hamano-Usami, A.; Ishida, T.; Okayama, A.; Yamaguchi, K.; Kamihira, S.; Watanabe, T. 5'-long terminal repeat-selective cpG methylation of latent human T-cell leukemia virus type 1 provirus in vitro and in vivo. *J. Virol.* **2002**, *76*, 9389–9397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Miyazaki, M.; Yasunaga, J.; Taniguchi, Y.; Tamiya, S.; Nakahata, T.; Matsuoka, M. Preferential selection of human T-cell leukemia virus type 1 provirus lacking the 5' long terminal repeat during oncogenesis. *J. Virol.* **2007**, *81*, 5714–5723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Satou, Y.; Yasunaga, J.; Yoshida, M.; Matsuoka, M. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 720–725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Giam, C.Z.; Semmes, O.J. HTLV-1 infection and adult T-cell leukemia/lymphoma—a tale of two proteins: Tax and hbz. *Viruses* **2016**, *8*, 161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Ma, G.; Yasunaga, J.; Matsuoka, M. Multifaceted functions and roles of HBZ in HTLV-1 pathogenesis. *Retirovirology* **2016**, *13*, 16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Mesnard, J.M.; Barbeau, B.; Cesaire, R.; Peloponese, J.M. Roles of HTLV-1 basic zip factor (HBZ) in viral chronicity and leukemic transformation. Potential new therapeutic approaches to prevent and treat HTLV-1-related diseases. *Viruses* **2015**, *7*, 6490–6505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Yamamoto-Taguchi, N.; Satou, Y.; Miyazato, P.; Ohshima, K.; Nakagawa, M.; Katagiri, K.; Kinashi, T.; Matsuoka, M. HTLV-1 BZIP factor induces inflammation through labile foxp3 expression. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Chen, L.; Liu, D.; Zhang, Y.; Zhang, H.; Cheng, H. Foxp3-dependent transformation of human primary CD4+ T lymphocytes by the retroviral protein Tax. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *466*, 523–529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Kannagi, M.; Hasegawa, A.; Takamori, A.; Kinpara, S.; Utsunomiya, A. The roles of acquired and innate immunity in human T-cell leukemia virus type 1-mediated diseases. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Takamori, A.; Hasegawa, A.; Utsunomiya, A.; Maeda, Y.; Yamano, Y.; Masuda, M.; Shimizu, Y.; Tamai, Y.; Sasada, A.; Zeng, N.; et al. Functional impairment of Tax-specific but not cytomegalovirus-specific CD8+ T lymphocytes in a minor population of asymptomatic human T-cell leukemia virus type 1-carriers. *Retirovirology* **2011**, *8*, 100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Mori, N.; Gill, P.S.; Mougdil, T.; Murakami, S.; Eto, S.; Prager, D. Interleukin-10 gene expression in adult T-cell leukemia. *Blood* **1996**, *88*, 1035–1045. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Niitsu, Y.; Urushizaki, Y.; Koshida, Y.; Terui, K.; Mahara, K.; Kohgo, Y.; Urushizaki, I. Expression of TGF- $\beta$  gene in adult T cell leukemia. *Blood* **1988**, *71*, 263–266. [[PubMed](#)]
114. Toulza, F.; Nosaka, K.; Tanaka, Y.; Schioppa, T.; Balkwill, F.; Taylor, G.P.; Bangham, C.R. Human T-lymphotropic virus type 1-induced cc chemokine ligand 22 maintains a high frequency of functional Foxp3+ regulatory t cells. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 183–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Bangham, C.R.; Toulza, F. Adult t cell leukemia/lymphoma: Foxp3(+) cells and the cell-mediated immune response to HTLV-1. *Adv. Cancer Res.* **2011**, *111*, 163–182. [[PubMed](#)]
116. Kannagi, M.; Shida, H.; Igarashi, H.; Kuruma, K.; Murai, H.; Aono, Y.; Maruyama, I.; Osame, M.; Hattori, T.; Inoko, H.; et al. Target epitope in the tax protein of human T-cell leukemia virus type I recognized by class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic t cells. *J. Virol.* **1992**, *66*, 2928–2933. [[PubMed](#)]
117. Tagaya, Y.; Gallo, R.C. The exceptional oncogenicity of HTLV-1. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Virgin, H.W.; Wherry, E.J.; Ahmed, R. Redefining chronic viral infection. *Cell* **2009**, *138*, 30–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Gessain, A.; Barin, F.; Vernant, J.C.; Gout, O.; Maurs, L.; Calender, A.; de The, G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* **1985**, *2*, 407–410. [[CrossRef](#)]
120. Osame, M.; Usuku, K.; Izumo, S.; Ijichi, N.; Amitani, H.; Igata, A.; Matsumoto, M.; Tara, M. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* **1986**, *1*, 1031–1032. [[CrossRef](#)]



121. Kubota, R.; Soldan, S.S.; Martin, R.; Jacobson, S. Selected cytotoxic T lymphocytes with high specificity for HTLV-I in cerebrospinal fluid from a HAM/TSP patient. *J. Neurovirol.* **2002**, *8*, 53–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Nagai, M.; Yamano, Y.; Brennan, M.B.; Mora, C.A.; Jacobson, S. Increased HTLV-I proviral load and preferential expansion of HTLV-I tax-specific CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from patients with HAM/TSP. *Ann. Neurol.* **2001**, *50*, 807–812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Bangham, C.R.; Araujo, A.; Yamano, Y.; Taylor, G.P. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2015**, *1*, 15012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Goon, P.K.; Hanon, E.; Igakura, T.; Tanaka, Y.; Weber, J.N.; Taylor, G.P.; Bangham, C.R. High frequencies of Th1-type CD4(+) T cells specific to HTLV-1 env and tax proteins in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Blood* **2002**, *99*, 3335–3341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Yamano, Y.; Coler-Reilly, A. HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells that produces an inflammatory positive feedback loop via astrocytes in HAM/TSP. *J. Neuroimmunol.* **2017**, *304*, 51–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Tattermusch, S.; Skinner, J.A.; Chaussabel, D.; Banchereau, J.; Berry, M.P.; McNab, F.W.; O'Garra, A.; Taylor, G.P.; Bangham, C.R. Systems biology approaches reveal a specific interferon-inducible signature in HTLV-1 associated myelopathy. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Goncalves, D.U.; Proietti, F.A.; Ribas, J.G.; Araujo, M.G.; Pinheiro, S.R.; Guedes, A.C.; Carneiro-Proietti, A.B. Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23*, 577–589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Kamoi, K.; Mochizuki, M. HTLV-1 uveitis. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Hlela, C.; Bittencourt, A. Infective dermatitis associated with HTLV-1 mimics common eczemas in children and may be a prelude to severe systemic diseases. *Dermatol. Clin.* **2014**, *32*, 237–248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Oliveira, P.D.; Kachimarek, A.C.; Bittencourt, A.L. Early onset of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) and adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL): Systematic search and review. *J. Trop. Pediatr.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Nascimento, M.C.; Primo, J.; Bittencourt, A.; Siqueira, I.; de Fatima Oliveira, M.; Meyer, R.; Schriefer, A.; Santos, S.B.; Carvalho, E.M. Infective dermatitis has similar immunological features to human T lymphotropic virus-type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Clin. Exp. Immunol.* **2009**, *156*, 455–462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. McKendall, R.R. Neurologic disease due to HTLV-1 infection. *Handb. Clin. Neurol.* **2014**, *123*, 507–530. [[PubMed](#)]
133. Robert-Guroff, M.; Blayney, D.W.; Safai, B.; Lange, M.; Gelmann, E.P.; Gutterman, J.W.; Mansell, P.W.; Goedert, J.L.; Groopman, J.E.; Steigbigel, N.H.; et al. HTLV-I-specific antibody in aids patients and others at risk. *Lancet* **1984**, *2*, 128–131. [[CrossRef](#)]
134. Beilke, M.A. Retroviral coinfections: HIV and HTLV: Taking stock of more than a quarter century of research. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **2012**, *28*, 139–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Augusto, A.; Augusto, O.; Taquimo, A.; Nhachigule, C.; Siyawadya, N.; Tembe, N.; Bhatt, N.; Mbofana, F.; Gudo, E.S. First description of HTLV-1/2 seroprevalence in HIV-infected inmates in mozambique. *J. Med. Virol.* **2017**, *89*, 1498–1502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. De Oliveira, E.H.; Oliveira-Filho, A.B.; Souza, L.A.; da Silva, L.V.; Ishak, M.O.; Ishak, R.; Vallinoto, A.C. Human T-cell lymphotropic virus in patients infected with HIV-1: Molecular epidemiology and risk factors for transmission in piaui, northeastern Brazil. *Curr. HIV Res.* **2012**, *10*, 700–707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Galetto, L.R.; Lunge, V.R.; Beria, J.U.; Tietzmann, D.C.; Stein, A.T.; Simon, D. Short communication: Prevalence and risk factors for human T cell lymphotropic virus infection in southern brazilian HIV-positive patients. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **2014**, *30*, 907–911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Gudo, E.S.; Abreu, C.M.; Mussa, T.; Augusto Ado, R.; Otsuki, K.; Chambo, E.; Amade, N.; Tanuri, A.; Ferreira, O.C., Jr.; Jani, I.V.; et al. Serologic and molecular typing of human T-lymphotropic virus among blood donors in maputo city, mozambique. *Transfusion* **2009**, *49*, 1146–1150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Kozlowski, A.G.; Matos, M.A.; Carneiro, M.A.; Lopes, C.L.; Teles, S.A.; Vicente, C.P.; Martins, R.M. Seroprevalence of htlv in a population of HIV1-infected patients in midwestern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **2016**, *58*, 80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

140. Nasir, I.A.; Ahmad, A.E.; Emeribe, A.U.; Shehu, M.S.; Medugu, J.T.; Babayo, A. Molecular detection and clinical implications of HTLV-1 infections among antiretroviral therapy-naive HIV-1-infected individuals in Abuja, Nigeria. *Virology* **2015**, *6*, 17–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Opaleye, O.O.; Igboama, M.C.; Ojo, J.A.; Odewale, G. Seroprevalence of HIV, HBV, HCV, and HTLV among pregnant women in southwestern Nigeria. *J. Immunoass. Immunochem.* **2016**, *37*, 29–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Silva, M.T.; Neves, E.S.; Grinsztejn, B.; de Melo Espindola, O.; Schor, D.; Araujo, A. Neurological manifestations of coinfection with HIV and human T-lymphotropic virus type 1. *AIDS* **2012**, *26*, 521–523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Klase, Z.; Jeang, K.T. Reciprocal functional pseudotyping of HIV-1 and HTLV-1 viral genomes by the heterologous counterpart envelope proteins. *Virology* **2013**, *443*, 106–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Spear, G.T.; Jiang, H.X.; Sullivan, B.L.; Gewurz, H.; Landay, A.L.; Lint, T.F. Direct binding of complement component C1q to human immunodeficiency virus (HIV) and human T lymphotropic virus-I (HTLV-I) coinfecting cells. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **1991**, *7*, 579–585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Smith, D.M.; Richman, D.D.; Little, S.J. HIV superinfection. *J. Infect. Dis.* **2005**, *192*, 438–444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Cook, L.B.; Rowan, A.G.; Melamed, A.; Taylor, G.P.; Bangham, C.R. HTLV-1-infected T cells contain a single integrated provirus in natural infection. *Blood* **2012**, *120*, 3488–3490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Leung, K.; Nabel, G.J. HTLV-1 transactivator induces interleukin-2 receptor expression through an NF- $\kappa$ B-like factor. *Nature* **1988**, *333*, 776–778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Stroud, J.C.; Oltman, A.; Han, A.; Bates, D.L.; Chen, L. Structural basis of HIV-1 activation by NF- $\kappa$ B—A higher-order complex of p50: Rela bound to the HIV-1 LTR. *J. Mol. Biol.* **2009**, *393*, 98–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Geddes, V.E.V.; Jose, D.P.; Leal, F.E.; Nixon, D.F.; Tanuri, A.; Aguiar, R.S. HTLV-1 tax activates HIV-1 transcription in latency models. *Virology* **2017**, *504*, 45–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Barrios, C.S.; Castillo, L.; Giam, C.Z.; Wu, L.; Beilke, M.A. Inhibition of HIV type 1 replication by human T lymphotropic virus types 1 and 2 tax proteins in vitro. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **2013**, *29*, 1061–1067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Baba, M.; Imai, T.; Yoshida, T.; Yoshie, O. Constitutive expression of various chemokine genes in human T-cell lines infected with human T-cell leukemia virus type 1: Role of the viral transactivator tax. *Int. J. Cancer* **1996**, *66*, 124–129. [[CrossRef](#)]
152. Cocchi, F.; DeVico, A.L.; Garzino-Demo, A.; Arya, S.K.; Gallo, R.C.; Lusso, P. Identification of rantes, mip-1  $\alpha$ , and mip-1  $\beta$  as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* **1995**, *270*, 1811–1815. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Pilotti, E.; Bianchi, M.V.; De Maria, A.; Bozzano, F.; Romanelli, M.G.; Bertazzoni, U.; Casoli, C. HTLV-1/-2 and HIV-1 co-infections: Retroviral interference on host immune status. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*, 372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Pedroso, C.; Netto, E.M.; Weyll, N.; Brites, C. Coinfection by HIV-1 and human lymphotropic virus type 1 in Brazilian children is strongly associated with a shorter survival time. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2011**, *57*, S208–S211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Beilke, M.A.; Theall, K.P.; O'Brien, M.; Clayton, J.L.; Benjamin, S.M.; Winsor, E.L.; Kissinger, P.J. Clinical outcomes and disease progression among patients coinfecting with HIV and human T lymphotropic virus types 1 and 2. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, *39*, 256–263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Regis, C.; Oliveira, A.; Brites, C. Onset of opportunistic infections in patients co-infected by HTLV-1 and HIV-1, with high CD4+ cells count. *Braz. J. Infect. Dis.* **2009**, *13*, 311–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Shibata, D.; Brynes, R.K.; Rabinowitz, A.; Hanson, C.A.; Slovak, M.L.; Spira, T.J.; Gill, P. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated adult T-cell leukemia-lymphoma in a patient infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Ann. Intern. Med.* **1989**, *111*, 871–875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Beilke, M.A.; Japa, S.; Moeller-Hadi, C.; Martin-Schild, S. Tropical spastic paraparesis/human T leukemia virus type 1-associated myelopathy in HIV type 1-coinfecting patients. *Clin. Infect. Dis.* **2005**, *41*, e57–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Berger, J.R.; Raffanti, S.; Svenningsson, A.; McCarthy, M.; Snodgrass, S.; Resnick, L. The role of HTLV in HIV-1 neurologic disease. *Neurology* **1991**, *41*, 197–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

160. Casseb, J.; de Oliveira, A.C.; Vergara, M.P.; Montanheiro, P.; Bonasser, F.; Meilman Ferreira, C.; Smid, J.; Duarte, A.J. Presence of tropical spastic paraparesis/human T-cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy (TSP/HAM)-like among HIV-1-infected patients. *J. Med. Virol.* **2008**, *80*, 392–398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Abrahao, M.H.; Lima, R.G.; Netto, E.; Brites, C. Short communication: Human lymphotropic virus type 1 coinfection modulates the synthesis of cytokines by peripheral blood mononuclear cells from HIV type 1-infected individuals. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **2012**, *28*, 806–808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Oo, Z.; Barrios, C.S.; Castillo, L.; Beilke, M.A. High levels of cc-chemokine expression and downregulated levels of CCR5 during HIV-1/HTLV-1 and HIV-1/HTLV-2 coinfections. *J. Med. Virol.* **2015**, *87*, 790–797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Uozumi, K. Treatment of adult T-cell leukemia. *J. Clin. Exp. Hematop.* **2010**, *50*, 9–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Yamada, Y.; Tomonaga, M.; Fukuda, H.; Hanada, S.; Utsunomiya, A.; Tara, M.; Sano, M.; Ikeda, S.; Takatsuki, K.; Kozuru, M.; et al. A new G-CSF-supported combination chemotherapy, lsg15, for adult T-cell leukaemia-lymphoma: Japan clinical oncology group study 9303. *Br. J. Haematol.* **2001**, *113*, 375–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Tsukasaki, K.; Hermine, O.; Bazarbachi, A.; Ratner, L.; Ramos, J.C.; Harrington, W., Jr.; O'Mahony, D.; Janik, J.E.; Bittencourt, A.L.; Taylor, G.P.; et al. Definition, prognostic factors, treatment, and response criteria of adult t-cell leukemia-lymphoma: A proposal from an international consensus meeting. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 453–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Ishida, T.; Hishizawa, M.; Kato, K.; Tanosaki, R.; Fukuda, T.; Taniguchi, S.; Eto, T.; Takatsuka, Y.; Miyazaki, Y.; Moriuchi, Y.; et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult t-cell leukemia-lymphoma with special emphasis on preconditioning regimen: A nationwide retrospective study. *Blood* **2012**, *120*, 1734–1741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Bazarbachi, A.; Hermine, O. Treatment with a combination of zidovudine and  $\alpha$ -interferon in naive and pretreated adult T-cell leukemia/lymphoma patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovir.* **1996**, *13*, S186–S190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Gill, P.S.; Harrington, W., Jr.; Kaplan, M.H.; Ribeiro, R.C.; Bennett, J.M.; Liebman, H.A.; Bernstein-Singer, M.; Espina, B.M.; Cabral, L.; Allen, S.; et al. Treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma with a combination of interferon alfa and zidovudine. *N. Engl. J. Med.* **1995**, *332*, 1744–1748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Bazarbachi, A.; Plumelle, Y.; Carlos Ramos, J.; Tortevoe, P.; Otrrock, Z.; Taylor, G.; Gessain, A.; Harrington, W.; Panelatti, G.; Hermine, O. Meta-analysis on the use of zidovudine and interferon-alfa in adult T-cell leukemia/lymphoma showing improved survival in the leukemic subtypes. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 4177–4183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Cook, L.B.; Rowan, A.G.; Demontis, M.A.; Sagawe, S.; Gillet, N.A.; Melamed, A.; Greiller, C.; Witkover, A.; Bangham, C.R.M.; Taylor, G.P. Long-term clinical remission maintained after cessation of zidovudine and interferon- $\alpha$  therapy in chronic adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int. J. Hematol.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. O'Mahony, D.; Morris, J.C.; Stetler-Stevenson, M.; Matthews, H.; Brown, M.R.; Fleisher, T.; Pittaluga, S.; Raffeld, M.; Albert, P.S.; Reitsma, D.; et al. EBV-related lymphoproliferative disease complicating therapy with the anti-CD2 monoclonal antibody, sipilizumab, in patients with T-cell malignancies. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 2514–2522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Ceesay, M.M.; Matutes, E.; Taylor, G.P.; Fields, P.; Cavenagh, J.; Simpson, S.; Ho, A.; Devereux, S.; Mufti, G.J.; Pagliuca, A. Phase II study on combination therapy with chop-zenapax for HTLV-I associated adult T-cell leukaemia/lymphoma (ATLL). *Leuk. Res.* **2012**, *36*, 857–861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Ishida, T.; Iida, S.; Akatsuka, Y.; Ishii, T.; Miyazaki, M.; Komatsu, H.; Inagaki, H.; Okada, N.; Fujita, T.; Shitara, K.; et al. The cc chemokine receptor 4 as a novel specific molecular target for immunotherapy in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 7529–7539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Ishida, T.; Joh, T.; Uike, N.; Yamamoto, K.; Utsunomiya, A.; Yoshida, S.; Saburi, Y.; Miyamoto, T.; Takemoto, S.; Suzushima, H.; et al. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody (kw-0761) for relapsed adult T-cell leukemia-lymphoma: A multicenter phase II study. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 837–842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Ishida, T.; Jo, T.; Takemoto, S.; Suzushima, H.; Uozumi, K.; Yamamoto, K.; Uike, N.; Saburi, Y.; Nosaka, K.; Utsunomiya, A.; et al. Dose-intensified chemotherapy alone or in combination with mogamulizumab in newly diagnosed aggressive adult T-cell leukaemia-lymphoma: A randomized phase II study. *Br. J. Haematol.* **2015**, *169*, 672–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

176. Ishida, T.; Utsunomiya, A.; Jo, T.; Yamamoto, K.; Kato, K.; Yoshida, S.; Takemoto, S.; Suzushima, H.; Kobayashi, Y.; Imaizumi, Y.; et al. Mogamulizumab for relapsed adult T-cell leukemia-lymphoma: Updated follow-up analysis of phase I and II studies. *Cancer Sci.* **2017**, *108*, 2022–2029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Ishida, T.; Fujiwara, H.; Nosaka, K.; Taira, N.; Abe, Y.; Imaizumi, Y.; Moriuchi, Y.; Jo, T.; Ishizawa, K.; Tobinai, K.; et al. Multicenter phase II study of lenalidomide in relapsed or recurrent adult T-cell leukemia/lymphoma: ATLL-002. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 4086–4093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
178. Ishitsuka, K.; Utsunomiya, A.; Katsuya, H.; Takeuchi, S.; Takatsuka, Y.; Hidaka, M.; Sakai, T.; Yoshimitsu, M.; Ishida, T.; Tamura, K. A phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory aggressive adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Sci.* **2015**, *106*, 1219–1223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
179. Nakano, D.; Ishitsuka, K.; Ikeda, M.; Tsuchihashi, R.; Okawa, M.; Okabe, H.; Tamura, K.; Kinjo, J. Screening of promising chemotherapeutic candidates from plants against human adult T-cell leukemia/lymphoma (IV): Phenanthroindolizidine alkaloids from tylophora tanakae leaves. *J. Nat. Med.* **2015**, *69*, 397–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
180. Pinto, M.T.; Slavov, S.N.; Valente, V.B.; Ubiali, E.M.; Covas, D.T.; Kashima, S. Evaluation of human T-lymphotropic virus prevalence/co-infection rates for a four-year period in a non-metropolitan blood center in southeast Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2016**, *49*, 232–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
181. Ishitsuka, K.; Kunami, N.; Katsuya, H.; Nogami, R.; Ishikawa, C.; Yotsumoto, F.; Tanji, H.; Mori, N.; Takeshita, M.; Miyamoto, S.; et al. Targeting Bcl-2 family proteins in adult T-cell leukemia/lymphoma: In vitro and in vivo effects of the novel Bcl-2 family inhibitor abt-737. *Cancer Lett.* **2012**, *317*, 218–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Witzens-Harig, M.; Giaisi, M.; Kohler, R.; Krammer, P.H.; Li-Weber, M. HTLV-1-associated adult T cell leukemia is highly susceptible to navitoclax due to enhanced bax expression. *Int. J. Cancer* **2016**, *138*, 507–514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Narita, T.; Ishida, T.; Ito, A.; Masaki, A.; Kinoshita, S.; Suzuki, S.; Takino, H.; Yoshida, T.; Ri, M.; Kusumoto, S.; et al. Cyclin-dependent kinase 9 is a novel specific molecular target in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* **2017**, *130*, 1114–1124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Dassouki, Z.; Sahin, U.; El Hajj, H.; Jollivet, F.; Kfoury, Y.; Lallemand-Breitenbach, V.; Hermine, O.; de The, H.; Bazarbachi, A. Atl response to arsenic/interferon therapy is triggered by sumo/pml/rnf4-dependent tax degradation. *Blood* **2015**, *125*, 474–482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Shimosaki, S.; Nakahata, S.; Ichikawa, T.; Kitanaka, A.; Kameda, T.; Hidaka, T.; Kubuki, Y.; Kurosawa, G.; Zhang, L.; Sudo, Y.; et al. Development of a complete human ige monoclonal antibody to transferrin receptor 1 targeted for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *485*, 144–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. El Hajj, H.; Khalil, B.; Ghandour, B.; Nasr, R.; Shahine, S.; Ghantous, A.; Abdel-Samad, R.; Sinjab, A.; Hasegawa, H.; Jabbour, M.; et al. Preclinical efficacy of the synthetic retinoid st1926 for treating adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* **2014**, *124*, 2072–2080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Tanaka, A.; Takeda, S.; Kariya, R.; Matsuda, K.; Urano, E.; Okada, S.; Komano, J. A novel therapeutic molecule against HTLV-1 infection targeting provirus. *Leukemia* **2013**, *27*, 1621–1627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
188. Coler-Reilly, A.L.G.; Sato, T.; Matsuzaki, T.; Nakagawa, M.; Niino, M.; Nagai, M.; Nakamura, T.; Takenouchi, N.; Araya, N.; Yagishita, N.; et al. Effectiveness of daily prednisolone to slow progression of human T-lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: A multicenter retrospective cohort study. *Neurotherapeutics* **2017**, *14*, 1084–1094. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
189. Martin, F.; Castro, H.; Gabriel, C.; Adonis, A.; Fedina, A.; Harrison, L.; Brodnicki, L.; Demontis, M.A.; Babiker, A.G.; Weber, J.N.; et al. Ciclosporin a proof of concept study in patients with active, progressive HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
190. Shirabe, S.; Nakamura, T.; Tsujino, A.; Nishiura, Y.; Furuya, T.; Goto, H.; Suenaga, A.; Nakane, S.; Yoshimura, T.; Nagataki, S. Successful application of pentoxifylline in the treatment of HTLV-I associated myelopathy. *J. Neurol. Sci.* **1997**, *151*, 97–101. [[CrossRef](#)]
191. Harrington, W.J., Jr.; Sheremata, W.A.; Snodgrass, S.R.; Emerson, S.; Phillips, S.; Berger, J.R. Tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy (TSP/HAM): Treatment with an anabolic steroid danazol. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **1991**, *7*, 1031–1034. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

192. Kuroda, Y.; Kurohara, K.; Fujiyama, F.; Takashima, H.; Endo, C.; Matsui, M.; Neshige, R.; Kakigi, R. Systemic interferon- $\alpha$  in the treatment of HTLV-I-associated myelopathy. *Acta Neurol. Scand.* **1992**, *86*, 82–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Yamasaki, K.; Kira, J.; Koyanagi, Y.; Kawano, Y.; Miyano-Kurosaki, N.; Nakamura, M.; Baba, E.; Suzuki, J.; Yamamoto, A.; Yamamoto, N.; et al. Long-term, high dose interferon- $\alpha$  treatment in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: A combined clinical, virological and immunological study. *J. Neurol. Sci.* **1997**, *147*, 135–144. [[CrossRef](#)]
194. Viana, G.M.; Silva, M.A.; Souza, V.L.; Lopes, N.B.; Silva, D.L.; Nascimento Mdo, D. Interferon  $\beta$ -1a treatment in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: A case report. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **2014**, *56*, 443–445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
195. Nakagawa, M.; Nakahara, K.; Maruyama, Y.; Kawabata, M.; Higuchi, I.; Kubota, H.; Izumo, S.; Arimura, K.; Osame, M. Therapeutic trials in 200 patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J. Neurovirol.* **1996**, *2*, 345–355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
196. Olindo, S.; Belrose, G.; Gillet, N.; Rodriguez, S.; Boxus, M.; Verlaeten, O.; Asquith, B.; Bangham, C.; Signate, A.; Smadja, D.; et al. Safety of long-term treatment of HAM/TSP patients with valproic acid. *Blood* **2011**, *118*, 6306–6309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
197. Lezin, A.; Gillet, N.; Olindo, S.; Signate, A.; Grandvaux, N.; Verlaeten, O.; Belrose, G.; de Carvalho Bittencourt, M.; Hiscott, J.; Asquith, B.; et al. Histone deacetylase mediated transcriptional activation reduces proviral loads in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients. *Blood* **2007**, *110*, 3722–3728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
198. Boostani, R.; Vakili, R.; Hosseiny, S.S.; Shoeibi, A.; Fazeli, B.; Etemadi, M.M.; Sabet, F.; Valizade, N.; Rezaee, S.A. Triple therapy with prednisolone, pegylated interferon and sodium valproate improves clinical outcome and reduces human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) proviral load, tax and HBZ mRNA expression in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Neurotherapeutics* **2015**, *12*, 887–895. [[PubMed](#)]
199. Yamauchi, J.; Coler-Reilly, A.; Sato, T.; Araya, N.; Yagishita, N.; Ando, H.; Kunitomo, Y.; Takahashi, K.; Tanaka, Y.; Shibagaki, Y.; et al. Mogamulizumab, an anti-CCR4 antibody, targets human T-lymphotropic virus type 1-infected CD8+ and CD4+ T cells to treat associated myelopathy. *J. Infect. Dis.* **2015**, *211*, 238–248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
200. Sa, K.N.; Macedo, M.C.; Andrade, R.P.; Mendes, S.D.; Martins, J.V.; Baptista, A.F. Physiotherapy for human T-lymphotropic virus 1-associated myelopathy: Review of the literature and future perspectives. *J. Multidiscip. Healthc.* **2015**, *8*, 117–125. [[PubMed](#)]
201. Matsuoka, M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). *Retrovirology* **2005**, *2*, 27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
202. Satoh, M.; Toma, H.; Sato, Y.; Takara, M.; Shiroma, Y.; Kiyuna, S.; Hirayama, K. Reduced efficacy of treatment of strongyloidiasis in HTLV-I carriers related to enhanced expression of IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$ 1. *Clin. Exp. Immunol.* **2002**, *127*, 354–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
203. Carvalho, E.M.; Da Fonseca Porto, A. Epidemiological and clinical interaction between HTLV-1 and strongyloides stercoralis. *Parasite Immunol.* **2004**, *26*, 487–497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
204. Gabet, A.S.; Mortreux, F.; Talarmin, A.; Plumelle, Y.; Leclercq, I.; Leroy, A.; Gessain, A.; Clity, E.; Joubert, M.; Wattel, E. High circulating proviral load with oligoclonal expansion of HTLV-1 bearing T cells in HTLV-1 carriers with strongyloidiasis. *Oncogene* **2000**, *19*, 4954–4960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
205. Gillet, N.A.; Cook, L.; Laydon, D.J.; Hlela, C.; Verdonck, K.; Alvarez, C.; Gotuzzo, E.; Clark, D.; Farre, L.; Bittencourt, A.; et al. Strongyloidiasis and infective dermatitis alter human T lymphotropic virus-1 clonality in vivo. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
206. Harrison, L.H.; Vaz, B.; Taveira, D.M.; Quinn, T.C.; Gibbs, C.J.; de Souza, S.H.; McArthur, J.C.; Schechter, M. Myelopathy among Brazilians coinfecting with human T-cell lymphotropic virus type I and HIV. *Neurology* **1997**, *48*, 13–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
207. Pomier, C.; Rabaoui, S.; Pouliquen, J.F.; Couppie, P.; El Guedj, M.; Nacher, M.; Lacoste, V.; Wattel, E.; Kazanji, M.; Mortreux, F. Antiretroviral therapy promotes an inflammatory-like pattern of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) replication in human immunodeficiency virus type 1/HTLV-1 co-infected individuals. *J. Gen. Virol.* **2013**, *94*, 753–757. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
208. Costin, J.M. Cytopathic mechanisms of HIV-1. *Virol. J.* **2007**, *4*, 100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

209. Shida, H.; Tochikura, T.; Sato, T.; Konno, T.; Hirayoshi, K.; Seki, M.; Ito, Y.; Hatanaka, M.; Hinuma, Y.; Sugimoto, M.; et al. Effect of the recombinant vaccinia viruses that express HTLV-I envelope gene on HTLV-I infection. *EMBO J.* **1987**, *6*, 3379–3384. [[PubMed](#)]
210. Fujii, H.; Shimizu, M.; Miyagi, T.; Kunihiro, M.; Tanaka, R.; Takahashi, Y.; Tanaka, Y. A potential of an anti-HTLV-I GP46 neutralizing monoclonal antibody (lat-27) for passive immunization against both horizontal and mother-to-child vertical infection with human T cell leukemia virus type-I. *Viruses* **2016**, *8*, 41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
211. Takahashi, K.; Takezaki, T.; Oki, T.; Kawakami, K.; Yashiki, S.; Fujiyoshi, T.; Usuku, K.; Mueller, N.; Osame, M.; Miyata, K.; et al. Inhibitory effect of maternal antibody on mother-to-child transmission of human T-lymphotropic virus type I. The mother-to-child transmission study group. *Int. J. Cancer* **1991**, *49*, 673–677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
212. Suehiro, Y.; Hasegawa, A.; Iino, T.; Sasada, A.; Watanabe, N.; Matsuoka, M.; Takamori, A.; Tanosaki, R.; Utsunomiya, A.; Choi, I.; et al. Clinical outcomes of a novel therapeutic vaccine with tax peptide-pulsed dendritic cells for adult T cell leukaemia/lymphoma in a pilot study. *Br. J. Haematol.* **2015**, *169*, 356–367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
213. Rowan, A.G.; Bangham, C.R. Is there a role for HTLV-1-specific CTL in adult T-cell leukemia/lymphoma? *Leuk. Res. Treat.* **2012**, *2012*, 391953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
214. Sugata, K.; Yasunaga, J.; Mitobe, Y.; Miura, M.; Miyazato, P.; Kohara, M.; Matsuoka, M. Protective effect of cytotoxic T lymphocytes targeting HTLV-1 BZIP factor. *Blood* **2015**, *126*, 1095–1105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
215. Willems, L.; Hasegawa, H.; Accolla, R.; Bangham, C.; Bazarbachi, A.; Bertazzoni, U.; Carneiro-Proietti, A.B.; Cheng, H.; Chieco-Bianchi, L.; Ciminale, V.; et al. Reducing the global burden of HTLV-1 infection: An agenda for research and action. *Antivir. Res.* **2017**, *137*, 41–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## HTLV-1 et cellules dendritiques

### Une relation en quête de maturation

Nicolas Futsch, Renaud Mahieux, Hélène Dutartre

> Les cellules dendritiques (CD) sont des cellules immunitaires qui jouent le rôle de sentinelles dans notre organisme. Présentes au niveau de la peau, des muqueuses et dans le sang, elles permettent la reconnaissance rapide des agents pathogènes lors d'une infection bactérienne ou virale. Elles entreprennent alors un processus de maturation et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires afin d'activer une réponse lymphocytaire spécifique de l'agent microbien. Elles jouent de ce fait un rôle important dans la mise en place d'une réponse immunitaire.

Le virus HTLV-1 (*human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1*) est l'agent étiologique de la leucémie/lymphome des cellules T de l'adulte (ou *adult T-cell leukemia/lymphoma*, ATLL) et de la paraparésie spastique tropicale/myélopathie associée à ce virus (ou *HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis*, HAM-TSP)<sup>1</sup>. Ce virus, qui infecte 5 à 10 millions de personnes dans le monde, est transmis par voie sanguine ou sexuelle et par l'allaitement prolongé du nourrisson [1]. Chez les individus infectés, le génome viral est majoritairement retrouvé *in vivo* dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Pourtant, *in vitro*, les cellules dendritiques sont plus susceptibles à l'infection productive par HTLV-1 que les lymphocytes autologues [2]. Localisées *in vivo* dans les muqueuses génitales, intestinales ou dans le sang, les cellules dendritiques se retrouvent potentielle-

<sup>1</sup> ATLL et HAM-TSP sont deux pathologies ayant pour origine l'infection par l'HTLV-1, caractérisées par des atteintes des lymphocytes matures (ATLL) ou neuro-musculaires (HAM-TSP).

ment en étroite interaction avec les cellules lymphocytaires infectées lors de la primo-infection. Il est par ailleurs intéressant de noter que ces cellules contribuent à la propagation du VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine de type 1), un rétrovirus proche d'HTLV-1, au sein de la population lymphocytaire [3]. Au vu de la diversité des cellules dendritiques dans l'organisme [4], de leur rôle dans l'établissement de la réponse immunitaire, et des différentes voies d'entrées d'HTLV-1 [1], nous avons examiné si tous les sous-types de cellules dendritiques étaient similairement sensibles à l'infection par l'HTLV-1, et si ces sous-types contribuaient de manière équivalente à la dissémination du virus dans l'organisme. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication récente dans la revue *PLOS Pathogens* [5].

#### Certains sous-types de cellules dendritiques sont résistants à l'infection par HTLV-1

Les populations de cellules dendritiques humaines des muqueuses et du sang sont rares *in vivo* et difficiles à obtenir. Pour pallier ces difficultés, l'utilisation de cellules dendritiques dérivées de monocytes (les MDCC) constitue une alternative. L'utilisation de différents cocktails de cytokines permet ainsi de différencier, *in vitro*, les monocytes primaires en cellules dendritiques immatures (IL-4 [*interleukin-4*]-DC), cellules dendritiques tolérogènes (TGF- $\beta$  [*transforming growth factor- $\beta$* ]-DC) ou cellules dendritiques inflammatoires (IFN- $\alpha$  [*interferon- $\alpha$* ]-DC). Ces trois populations miment respectivement les

Centre international de recherche en infectiologie, Équipe oncogénèse rétrovirale, Inserm U1111 - université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, 46, allée d'Italie, F-69007, Lyon, France.

Équipe labellisée « Ligue Nationale Contre le Cancer ».

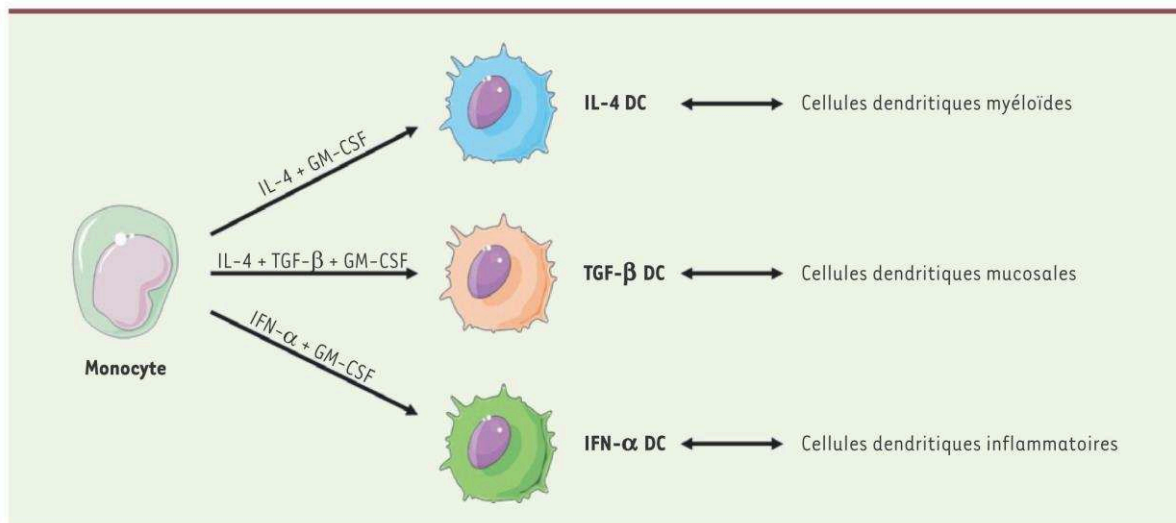
[helene.dutartre@ens-lyon.fr](mailto:helene.dutartre@ens-lyon.fr)

cellules dendritiques myéloïdes du sang, les cellules dendritiques des muqueuses, et celles résidant au niveau des sites d'inflammation (Figure 1). Les IL-4-DC et TGF- $\beta$ -DC présentent un phénotype immature, avec une faible expression des marqueurs de surface CD86 (ou B7-2), CD40 (deux protéines de co-stimulation exprimées par les cellules présentatrices d'antigènes) et HLA-DR (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II), par opposition aux IFN- $\alpha$ -DC qui expriment fortement ces marqueurs. Pour évaluer leur susceptibilité à l'infection virale, les cellules dendritiques ainsi générées *in vitro* ont été mises en culture avec des cellules lymphocytaires infectées par HTLV-1. En effet, seul un contact étroit entre une cellule infectée et une cellule cible permet d'établir l'infection de la cellule cible, le virus libre

(→) Voir la Synthèse de G Rizkallah, m/s n° 6-7, juin-juillet 2015, page 629

L'infection des cellules dendritiques a été évaluée d'une part, par la présence de l'ADN proviral (ADN double brin intégré dans le génome cellulaire) et, d'autre part, en suivant au cours du temps l'accumulation de protéines virales dites structurales (comme la protéine de matrice p19) ou régulatrices (comme Tax, absente de la particule virale). Ces méthodes ont permis de mettre en évidence une infection effective des IL-4-DC, mais pas des cellules TGF- $\beta$ -DC et IFN- $\alpha$ -DC, suggérant que ces deux dernières sont résistantes à l'infection. La résistance à l'infection des IFN- $\alpha$ -DC n'est pas liée à une diminution d'expression par les cellules





**Figure 1.** Schéma de différenciation des cellules dendritiques IL-4-DC, TGF- $\beta$ -DC et IFN- $\alpha$ -DC à partir de monocytes isolés du sang. Les IL-4-DC (interleukin-4 dendritic cells), TGF- $\beta$ -DC (transforming-growth factor- $\beta$  dendritic cells) et IFN- $\alpha$ -DC (interferon- $\alpha$  dendritic cells) miment respectivement les cellules dendritiques myéloïdes, muqueuses et inflammatoires.

des récepteurs du virus tels que NRP-1/BDCA-4 (*neuropilin-1*) et DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin*). En effet, bien que ces récepteurs soient plus exprimés à la surface des IL-4-DC que sur les IFN- $\alpha$ -DC, la quantité de virus capturée par les IFN- $\alpha$ -DC est plus importante que celle capturée par les IL-4-DC. Une corrélation inverse entre la capture virale et l'infection productive est donc observée.

#### L'état de maturation des cellules dendritiques contrôle leur susceptibilité à l'infection par HTLV-1

Les IFN- $\alpha$ -DC produisent naturellement l'interféron de type-I (IFN-I, famille d'interférons à laquelle appartient l'IFN- $\alpha$ ), molécule antivirale limitant l'infection des lymphocytes T par l'HTLV-1 [7], et qui pourrait réduire l'infection des cellules dendritiques. Pourtant, l'ajout d'IFN- $\alpha$  recombinant ou de surnageant de culture d'IFN- $\alpha$ -DC au milieu de culture des IL-4-DC ne modifie pas leur infection par l'HTLV-1. La résistance des IFN- $\alpha$ -DC n'est donc pas liée à la production d'IFN-I par ces cellules. En revanche, le traitement

d'IL-4-DC par des agents induisant leur maturation (évaluée par l'augmentation d'expression des marqueurs HLA-DR, CD40 et CD86) diminue leur susceptibilité à l'infection par l'HTLV-1, comme observé pour les IFN- $\alpha$ -DC.

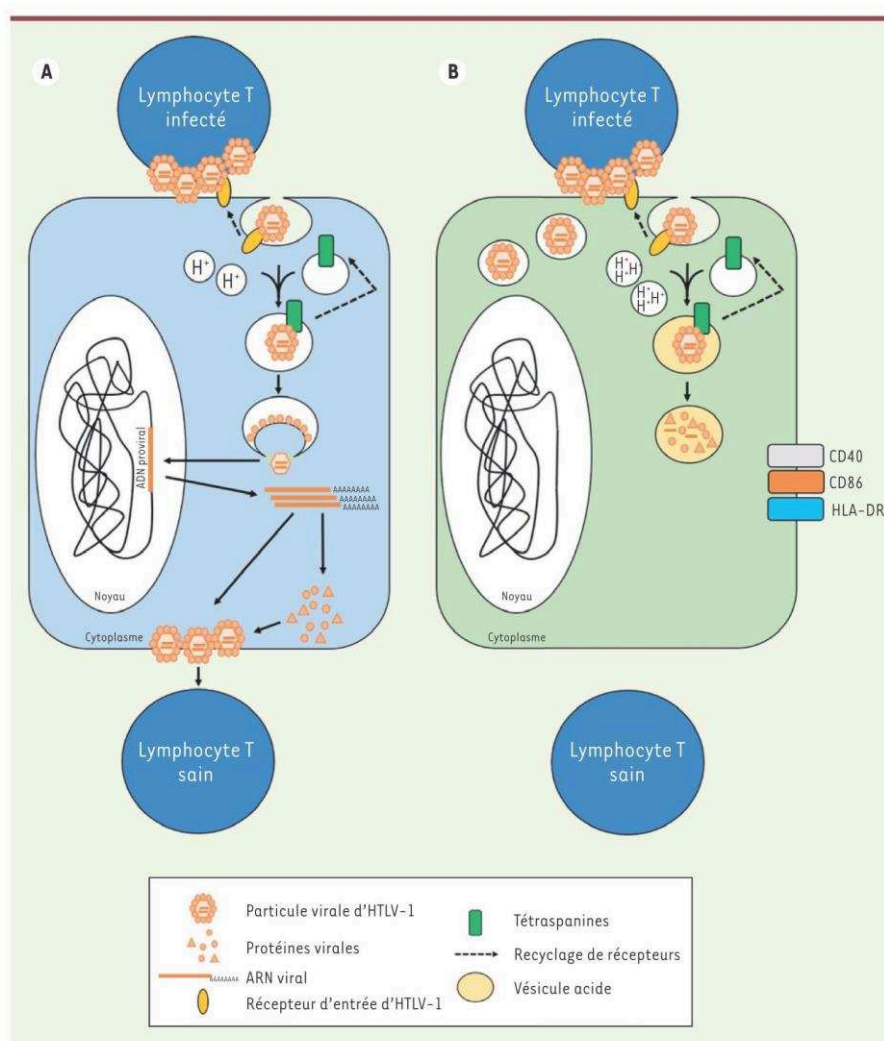
Pour identifier le mécanisme responsable de la résistance des cellules dendritiques matures à l'infection par l'HTLV-1, nous avons comparé le trafic du virus dans des cellules dendritiques immatures et matures. L'utilisation de drogues qui ciblent les différents modes d'endocytose révèle que l'HTLV-1 utilise selon les cellules, des mécanismes d'entrée qui s'avèrent partiellement différents : la macropinocytose et l'endocytose dépendante de la clathrine pour l'entrée dans les IL-4-DC ; uniquement l'endocytose dépendante de la clathrine pour l'entrée dans les IFN- $\alpha$ -DC. En revanche, dans les IL-4-DC, comme dans les cellules dendritiques matures, le virus se localise dans des vésicules riches en tétraspanines (ou corps multivésiculaires), à l'instar du VIH-1 [3]. La restriction observée dans les IFN- $\alpha$ -DC semble ainsi dépendre d'un mécanisme qui intervient après l'entrée et la compartimentation du virus.

Les cellules dendritiques matures présentent des vésicules plus acides que les cellules dendritiques immatures [8]. Aussi, pour déterminer l'influence du pH sur l'infection des cellules, les vésicules présentes dans les IL-4-DC ont été acidifiées par un traitement avec le chlorure de diphényliodonium. Dans ces conditions, les IL-4-DC deviennent alors résistantes à l'infection. L'infection productive des cellules dendritiques par l'HTLV-1 nécessite donc un passage du virus par des vésicules de pH neutre, une caractéristique de l'immaturité des cellules dendritiques. En revanche, la neutralisation du milieu vésiculaire par la chloroquine, qui inhibe l'acidification des vésicules d'endocytose, ne restaure pas totalement l'infection, ce qui suggère l'existence d'autres mécanismes de restriction dans les cellules dendritiques matures.

#### L'état de maturation des cellules dendritiques contrôle aussi la transmission d'HTLV-1 aux lymphocytes T

Nous avons examiné l'impact du sous-type de cellules dendritiques





**Figure 2. Modèle de l'infection ou de la restriction du virus HTLV-1, dans les cellules dendritiques immatures ou matures.** Le virus HTLV-1, transmis à la cellule dendritique par contact avec un lymphocyte T infecté, se lie à ses récepteurs d'entrée sur la membrane plasmique. Le virus est ensuite endocyté et se retrouve au sein de vésicules riches en tétraspanines. Dans les cellules dendritiques immatures (**A**), le pH des vésicules serait optimal pour assurer la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de l'endosome. La capside, contenant le génome viral, est alors véhiculée jusqu'au noyau. L'ARN viral est rétrotranscrit en ADN viral, qui s'intègre dans le génome de l'hôte. À partir de cet ADN proviral seront synthétisés les ARN viraux et les protéines virales, qui s'assemblent à la membrane plasmique de la cellule dendritique, permettant l'infection de lymphocytes T sains voisins. L'acidité des vésicules, accrue dans les cellules dendritiques matures (**B**), empêcherait la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome, ce qui mettrait fin au cycle viral.

interagissant avec l'HTLV-1, sur la transmission du virus aux lymphocytes T. Pour le VIH-1, le principal moyen de transmission du virus aux lymphocytes T ne nécessite pas l'infection de la cellule dendritique, la cellule dendritique servant de cheval de Troie pour la transmission du virus aux cellules lymphocytaires [9]. Ce processus est qualifié de trans-infection. Les IFN- $\alpha$ -DC capturant plus de virus HTLV-1 que les IL-4-DC, nous avons donc émis l'hypothèse qu'une trans-infection des lymphocytes T par les IFN- $\alpha$ -DC pourrait représenter un moyen efficace de transmission d'HTLV-1 aux lymphocytes T sans que

l'infection de la cellule dendritique soit nécessaire. Pour tester cette hypothèse, les IL-4-DC ou les IFN- $\alpha$ -DC ont été cocultivées avec des cellules lymphocytaires infectées par l'HTLV-1 pendant un temps court, permettant ainsi la capture du virus par ces cellules. Les IL-4-DC et les IFN- $\alpha$ -DC ont été isolées des cellules infectées et cultivées en présence de cellules Jurkat LTR-Luc<sup>2</sup>. De façon sur-

prenante, les IFN- $\alpha$ -DC transmettent moins efficacement le virus aux cellules Jurkat LTR-Luc que les IL-4-DC. Cette différence n'est pas liée à une capacité réduite des IFN- $\alpha$ -DC d'interagir avec les cellules Jurkat LTR-Luc. En revanche, elle est une conséquence de l'acidité de leurs vésicules. En effet, lorsque le pH des vésicules est augmenté dans les IFN- $\alpha$ -DC, leur capacité à transmettre le virus s'accroît.

### Conclusion

Les différentes populations de cellules dendritiques ne sont donc pas similairement susceptibles à l'infection

<sup>2</sup> Ces cellules lymphocytaires, dites « rapporteuses », ont été transfectées par un plasmide dans lequel la séquence terminale longue répétée (LTR) du virus HTLV-1 est clonée en amont du gène codant la luciférase (Luc), une protéine bioluminescente permettant d'évaluer l'activité du LTR, et donc l'infection.

par HTLV-1. Les cellules dendritiques immatures (IL-4-DC) sont plus susceptibles que les cellules dendritiques tolérrogènes (TGF- $\beta$ -DC), elles-mêmes plus susceptibles que les cellules dendritiques inflammatoires (IFN- $\alpha$ -DC). La résistance à l'infection repose sur leur degré de maturation et, *a fortiori*, du niveau d'acidification de leurs vésicules, ce qui conditionne leur capacité à transmettre le virus aux lymphocytes T (Figure 2). Très récemment, il a été montré que les cellules dendritiques myéloïdes CD141<sup>+</sup> (ou BDCA-3 Thrombomoduline) étaient résistantes à l'infection par de nombreux virus enveloppés, dont le VIH-1, alors que les cellules dendritiques myéloïdes CD1c<sup>+</sup> (ou BDCA-1) y sont permissives [10]. Pour autant, ces deux populations dendritiques ont un rôle complémentaire lors de l'infection, puisque les cellules CD141<sup>+</sup>, restrictives à l'infection, organisent la réponse immunitaire après présentation croisée d'antigènes viraux portés par les cellules

CD1c<sup>+</sup> infectées. Savoir si ces cellules adoptent un comportement similaire à la suite de l'infection par l'HTLV-1 permettrait d'étudier les interactions entre virus et cellules dendritiques *in vivo*, et de comprendre si les cellules dendritiques tendent à favoriser la mise en place de la réponse immunitaire ou la propagation du virus dans l'organisme, ou les deux.  $\diamond$

#### HTLV-1 and dendritic cells: a relationship in search of maturation

#### REMERCIEMENTS

Nicolas Futsch est financé par une bourse de thèse attribuée par la Ligue Contre le Cancer.

#### LIENS D'INTÉRÊT

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

#### RÉFÉRENCES

1. Gessain A, Cassar O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Front Microbiol* 2012; 3 : 388.
2. Alais S, Mahieux R, Dutartre H. Viral source-independent high susceptibility of dendritic cells

to human T-cell leukemia virus type 1 infection compared to that of T lymphocytes. *J Virol* 2015; 89 : 10580-90.

3. Cavois M, Neidleman J, Greene WC. The achilles heel of the trojan horse model of HIV-1 trans-infection. *PLoS Pathog* 2008; 4 : e1000051.
4. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology* 2013; 140 : 22-30.
5. Rizkallah G, Alais S, Futsch N, et al. Dendritic cell maturation, but not type I interferon exposure, restricts infection by HTLV-1, and viral transmission to T-cells. *PLoS Pathog* 2017; 13 : e1006353.
6. Rizkallah G, Mahieux R, Dutartre H. Transmission intercellulaire de HTLV-1: des mécanismes loin d'être complètement élucidés. *Med Sci (Paris)* 2015; 31 : 629-37.
7. Cachat A, Chevalier SA, Alais, et al. Alpha interferon restricts human T-lymphotropic virus type 1 and 2 *de novo* infection through PKR activation. *J Virol* 2013; 87 : 13386-96.
8. Savina A, Jancic C, Hugues S, et al. NFX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 2006; 126 : 205-18.
9. Sewald X, Ladinsky MS, Uchil PD, et al. Retroviruses use CD169-mediated trans-infection of permissive lymphocytes to establish infection. *Science* 2015; 350 : 563-7.
10. Silvin A, Yu CI, Lahaye X, et al. Constitutive resistance to viral infection in human CD141<sup>+</sup> dendritic cells. *Sci Immunol* 2017; 2 : eaai8071.

## NOUVELLE

### Tax : une oncoprotéine virale qui aime les CREB sucrés !

Claudine Pique<sup>1-3</sup>, Tarik Issad<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Inserm, U1016, Institut Cochin, 22, rue Méchain, 75014 Paris, France.

<sup>2</sup>CNRS, UMR8104, Paris, France.

<sup>3</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

[claudine.pique@inserm.fr](mailto:claudine.pique@inserm.fr)

[tarik.issad@inserm.fr](mailto:tarik.issad@inserm.fr)

> Le virus HTLV-1 (*human T-cell lymphotropic virus type 1*), agent étiologique de la leucémie à cellules T de l'adulte et de pathologies inflammatoires, est le seul rétrovirus associés à un cancer chez l'homme. On estime à environ 15 millions le nombre de personnes actuellement porteuses du virus HTLV-1 à travers le monde, les principaux foyers étant localisés en Afrique centrale, dans les Caraïbes, en Amérique Centrale et du Sud et au Japon [1]. L'HTLV-1 peut entraîner une lymphoprolifération maligne très agressive touchant les lymphocytes T

CD4<sup>+</sup>, qui se déclare de manière tardive chez des patients ayant généralement été contaminés de nombreuses années avant l'apparition des premiers symptômes [2].

Par sa capacité à perturber de nombreuses voies et machineries cellulaires, l'oncoprotéine virale Tax (*transactivator of pX region*) joue un rôle majeur dans les processus prolifératifs et anti-apoptotiques associés à la transformation induite par le virus [3]. L'expression du génome viral, elle-même contrôlée par Tax, active le pro-

moteur positionné dans la séquence terminale répétée en 5' du génome, ou LTR (*long terminal repeat 5'*), via le recrutement du facteur de transcription CREB (*cAMP-response element-binding protein*) (Figure 1). Tax stimule également l'activité transcriptionnelle de CREB, en induisant la phosphorylation de la sérine 133 de la protéine [4]. En terme de modifications post-transcriptionnelles, CREB est également la cible d'une glycosylation particulière, la O-GlcNac glycosylation (ou O-GlcNAcylation) [5].